

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019196

International filing date: 22 December 2004 (22.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-425673  
Filing date: 22 December 2003 (22.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

27.12.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 2 月 2 2 日  
Date of Application:

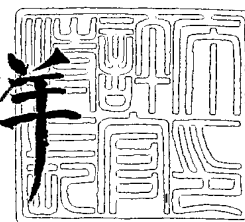
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 4 2 5 6 7 3  
Application Number:  
[ST. 10/C] :            [ J P 2 0 0 3 - 4 2 5 6 7 3 ]

出      願      人            サントリー株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 1 月 2 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 6 4 8 4

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-0117  
【提出日】 平成15年12月22日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
【発明者】  
    【住所又は居所】 石川県金沢市本多町 1 - 8 - 1 2   A - 3 0 1  
    【氏名】 大山 莞爾  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000001904  
    【氏名又は名称】 サントリー株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100080034  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 原 謙三  
    【電話番号】 06-6351-4384  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100113701  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 木島 隆一  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100116241  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 金子 一郎  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 003229  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA の全部又は一部、あるいは当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA の全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。

**【請求項 2】**

$\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列を有する遺伝子。

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

**【請求項 3】**

$\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち、253 ないし 1698 番目の塩基配列を有する遺伝子。

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち、253 ないし 1698 番目の塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

**【請求項 4】**

$\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の 1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

**【請求項 5】**

配列番号 3 に示される塩基配列からなる DNA の全部又は一部、あるいは当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA の全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。

**【請求項 6】**

$\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 3 に示される塩基配列を有する遺伝子。

(b) 配列番号 3 に示される塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

**【請求項 7】**

$\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち、194 ないし 1066 番目の塩基配列を有する遺伝子。

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち、194 ないし 1066 番目の塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

**【請求項 8】**

$\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質、

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の 1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失

、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【請求項 9】

配列番号 5 に示される塩基配列からなる DNA の全部又は一部、あるいは当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA の全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\Delta 5$  脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。

【請求項 10】

$\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 5 に示される塩基配列を有する遺伝子。

(b) 配列番号 5 に示す塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【請求項 11】

$\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 5 に示される塩基配列のうち、375 ないし 1829 番目の塩基配列を有する遺伝子。

(b) 配列番号 5 に示される塩基配列のうち、375 ないし 1829 番目の塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【請求項 12】

$\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。

(a) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質、

(b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列の 1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 12 の何れか 1 項に記載の遺伝子によってコードされるたんぱく質。

【請求項 14】

以下の (a) 又は (b) 記載のたんぱく質。

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質。

【請求項 15】

以下の (a) 又は (b) 記載のたんぱく質。

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質。

【請求項 16】

以下の (a) 又は (b) 記載のたんぱく質。

(a) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

(b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質。

【請求項 17】

請求項 13 ～ 16 の何れか 1 項に記載のたんぱく質を認識する抗体。

【請求項 18】

少なくとも請求項 1 ～ 12 の何れか 1 項に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

**【請求項 19】**

少なくとも請求項 1～12 の何れか 1 項に記載の遺伝子を導入してなる形質転換体。

**【請求項 20】**

少なくとも請求項 1～12 の何れか 1 項に記載の遺伝子が発現可能に導入された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織。

**【請求項 21】**

少なくとも請求項 1～12 の何れか 1 項に記載の遺伝子が発現可能に導入され、脂肪酸組成が改変された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織。

**【請求項 22】**

請求項 20 又は 21 に記載の植物体の繁殖材料。

**【請求項 23】**

請求項 21 に記載の植物体又は植物体の組織を用いることを特徴とする脂肪酸生産方法。

**【請求項 24】**

請求項 23 に記載の脂肪酸生産方法により得られた、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、エイコサテトラエン酸、およびエイコサペンタエン酸から選択される少なくとも 1 つ含む素材。

**【請求項 25】**

少なくとも請求項 1～12 の何れか 1 項に記載の遺伝子を用いて脂肪酸組成を改変する方法。

**【請求項 26】**

請求項 1～12 の何れか 1 項に記載の遺伝子における少なくとも一部の塩基配列又はその相補配列をプローブとして用いた遺伝子検出器具。

**【請求項 27】**

請求項 13～16 の何れか 1 項に記載のたんぱく質を用いて、当該たんぱく質を調節する遺伝子、又は当該たんぱく質を調節する物質をスクリーニングする方法。

**【請求項 28】**

請求項 27 に記載のスクリーニング方法により得られた遺伝子又は物質。

【書類名】明細書

【発明の名称】ゼニゴケ由来の不飽和脂肪酸合成系酵素遺伝子及びその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) 由来の不飽和脂肪酸合成系遺伝子、すなわち、 $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化酵素、及び  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長酵素の遺伝子とその利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

アラキドン酸、エイコサペンタエン酸 (以下、適宜「EPA」と略記する) 等の高度不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid; PUFA) は、ヒトにおいて神経系を中心とした細胞膜脂質に多く含まれている。これらの高度不飽和脂肪酸は、プロスタグランジンやロイコトリエンといった、生理活性物質の前駆体として作用しており、薬理学的に非常に重要である。近年、アラキドン酸や EPA を含む健康食品も販売されている。また、脂肪酸は、洗剤や生分解性プラスチックの原料にもなるため、素材としても注目されている。

【0003】

高度不飽和脂肪酸は、現在、培養微生物又は魚油からの抽出により生産されている。このため、生産コストが高いこと、エネルギー使用量・廃棄物量が多くなること、特に魚油から調製する方法では、魚資源が限られていることが問題になっている。

【0004】

アラキドン酸及び EPA は、それぞれリノール酸及び  $\alpha$ -リノレン酸を起点として、 $\Delta 6$  不飽和化、脂肪酸鎖長延長及び  $\Delta 5$  不飽和化という 3 つの連続した反応により生合成されと考えられている。これらの反応は、それぞれ、 $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化酵素 (以下、「 $\Delta 6$  不飽和化酵素」と略記する)、 $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長酵素 (以下、「 $\Delta 6$  鎖長延長酵素」と略記する) 及び  $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化酵素 (以下、「 $\Delta 5$  不飽和化酵素」と略記する) により触媒される。

【0005】

$\Delta 6$  不飽和化酵素の遺伝子は、いくつかの植物種でクローン化されている。例えば、ケイ藻、ヒメツリガネゴケ、ヤノウエノアカゴケ、ボリジ、ムラサキ、サクラソウ及びアネモネから  $\Delta 6$  不飽和化酵素の遺伝子がクローン化されている。また、植物以外では、糸状菌、線虫、ラン藻、ラット及びヒトから  $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子がクローン化されている (非特許文献 1 ~ 13 参照)。また、ラン藻のものを除いて、これらの  $\Delta 6$  不飽和化酵素は、いずれも N 末端にシトクロム b5 ドメインが存在する。

【0006】

$\Delta 6$  鎖長延長酵素の遺伝子は、最初に糸状菌及び線虫からクローン化された (非特許文献 14 及び 15 参照)。植物種では、唯一ヒメツリガネからクローン化されている (非特許文献 16 参照)。

【0007】

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) には、スフィンゴ脂質の長鎖飽和アシル鎖合成に関与する ELO2 蛋白及び ELO3 蛋白が存在し (非特許文献 17 参照)、 $\Delta 6$  鎖長延長酵素のアミノ酸配列は、これらと相同性を示す。一方、植物には、別タイプの脂肪酸鎖長延長酵素である  $\beta$ -ケトアシル CoA 合成酵素 (KCS) が存在する。この酵素は、長鎖飽和/一価不飽和脂肪酸の鎖長延長を触媒する (非特許文献 15 及び 18 参照)。しかしながら、 $\Delta 6$  鎖長延長酵素遺伝子及び酵母 ELO2/ELO3 遺伝子は、KCS 遺伝子との直接的な進化上の関係は見られない (非特許文献 15 及び 16 参照)。

【0008】

$\Delta 5$  不飽和化酵素の遺伝子は、糸状菌から、初めてクローン化された (非特許文献 19 及び 20 参照)。 $\Delta 5$  不飽和化酵素の構造は  $\Delta 6$  不飽和化酵素と共通しており、N 末端にシトクロム b5 ドメインを有する。 $\Delta 5$  不飽和化酵素遺伝子は、ケイ藻、線虫、ラット、ヒト、ヒメツリガネゴケなどからクローン化されている (非特許文献 1, 21 ~ 24 参照)

)。

## 【0009】

陸上植物は、コケ植物（コケ植物門(Bryophyta)）、シダ植物、裸子植物及び被子植物から構成されている。コケ植物は陸上植物の中で最も古くに分岐した群であり、セン類（セン類綱(Bryosida)）、タイ類（タイ類綱(Hepaticopsida)）及びツノゴケ類の3つのグループから構成されている。ゼニゴケは、上記生物のうちヒメツリガネゴケに分類上最も近いが、ヒメツリゴケはセン類に属しており、ゼニゴケはタイ類綱の中のゼニゴケ亜綱(Marchantiidae)に属している。上記3つのグループは、約4億3千年前には、すでに分岐していたことは確かである。したがって、同じコケといっても、ヒメツリガネゴケとゼニゴケとは、例えば2億年前に分化したシロイナズナとイネとの違いどころでなく、進化上大きく異なる（非特許文献25参照）。

## 【0010】

ゼニゴケ由来の高度不飽和脂肪酸合成系酵素遺伝子としては、上記のKCS様の鎖長延長酵素遺伝子のMpFAE2及びMpFAE3が取得されている（非特許文献26及び27参照）。しかしながら、MpFAE2及びMpFAE3は $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子ではない。

## 【0011】

上述のように、多くの高度脂肪酸合成系酵素遺伝子が様々な生物種からクローン化されているが、アラキドン酸、EPA等の、C20以上で不飽和度4以上の高度不飽和脂肪酸を植物中で生産させた例は少ない。このような例として、ケイ藻由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素と、ヒメツリガネゴケ由来の $\Delta 6$ 鎖長延長酵素とをアマで発現させ、アラキドン酸及びEPAを生産させた報告があるが、その詳細は不明である（非特許文献24参照）。

【非特許文献1】Eur. J. Biochem. 269, p4105, 2002

【非特許文献2】Plant J. 15, p39, 1998

【非特許文献3】Eur. J. Biochem., 267, p3801, 2000

【非特許文献4】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, p4211, 1997

【非特許文献5】Lipids 37, 417, 2002

【非特許文献6】FEBS Lett. 542, p100, 2003

【非特許文献7】Whitney et al., Planta Epub 2003

【非特許文献8】Lipids 34, p649, 1999

【非特許文献9】Gene, 238, p445 1999

【非特許文献10】Biochem J. 330, p611 1998

【非特許文献11】Plant Mol. Biol., 22, p293 1993

【非特許文献12】Biochem. Biophys. res. Commun. 255, p575, 1999

【非特許文献13】J. Biol. Chem. 274, p471, 1999

【非特許文献14】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, p8284, 2000

【非特許文献15】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, p6421, 2000

【非特許文献16】Plant J. 31, p255, 2002

【非特許文献17】J. Biol. Chem., 272, p17376, 1997

【非特許文献18】Plant Cell 7, p309, 1995

【非特許文献19】J. Biol. Chem. 273, p29360, 1998

【非特許文献20】J. Biol. Chem. 273, p19055

【非特許文献21】FEBS Lett. 439, p215, 1998

【非特許文献22】Arch. Biochem. Biophys. 391, p8, 2001

【非特許文献23】J. Biol. Chem. 274, p37335, 1999

【非特許文献24】J. Biol. Chem. 278, 35115, 2003

【非特許文献25】HYPERLINK "<http://www.nibb.ac.jp/~mhasebe/Physcomitrella.html>" <http://www.nibb.ac.jp/~mhasebe/Physcomitrella.html>

【非特許文献26】Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p605, 2003

【非特許文献 27】 Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p1667, 2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

上述のように、アラキドン酸や EPA 等の高度不飽和脂肪酸の生産は、培養微生物又は魚油からの抽出により生産されているため、生産コストが高いこと、エネルギー使用量・廃棄物量が多くなること、魚資源が限られていること等の問題点を有している。アラキドン酸や EPA 等の高度不飽和脂肪酸は、分子内に二重結合を複数有するというユニークな物性を持っているため、様々な工業用途（例えばフィルム、生分解性プラスチック、機能性繊維、潤滑油、洗剤の素材等）にも利用可能となる。このような高度不飽和脂肪酸を遺伝子組み換え植物により生産することにより、生産コストを低減でき、同時に、より環境にやさしい生産プロセスを実現することができると期待される。遺伝子組み換え技術を用いて、これらの高度不飽和脂肪酸を、油糧植物で大量生産できるようになれば、安価な多目的原料として非常に有用である。

【0013】

一方、植物に異種生物の遺伝子を発現させる場合、その遺伝子が植物内でどの程度良好に機能するかは、転写、翻訳、その後の修飾などの過程があるため、予想することは困難である。特に、複数の異種生物の遺伝子を発現させる場合、上記非特許文献 24 のように異なる生物種由来の複数の遺伝子を発現させるより、同一の種に由来する複数の遺伝子を発現させるほうが植物内で良好に機能することが予想される。また、最初の陸上植物であるコケ類のゼニゴケは、高等植物のモデル系として注目されており、その遺伝子は植物内で良好に機能することが期待できる。したがって、ゼニゴケ由来の高度不飽和脂肪酸合成酵素遺伝子、すなわち  $\Delta 5$  不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子及び  $\Delta 6$  鎖長延長酵素遺伝子を取得することができれば、これらの遺伝子を植物に導入することにより、アラキドン酸や EPA が植物内で効率よく蓄積されることが期待できる。

【0014】

また、ゼニゴケと同じコケ植物のヒメツリガネゴケからは  $\Delta 5$  不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子及び  $\Delta 6$  鎖長延長酵素遺伝子がクローン化されているが、ゼニゴケとヒメツリガネゴケは進化上大きく異なっており、ヒメツリガネゴケの遺伝子に基づいてゼニゴケの遺伝子を取得することは、現在の技術水準をもってしても容易にできることではない。

【0015】

本発明は、上記従来の問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、高等植物中でアラキドン酸や EPA を生産し得る、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) 由来の不飽和脂肪酸合成酵素遺伝子、すなわち  $\Delta 5$  不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子及び  $\Delta 6$  鎖長延長酵素遺伝子、及びその利用法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) 由来の cDNA クローンから、上記  $\Delta 6$  不飽和化酵素、 $\Delta 5$  不飽和化酵素及び  $\Delta 6$  鎖長延長酵素をコードする遺伝子を同定し、更にこれらの遺伝子をメタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) に導入して発現させることに成功し、これらの遺伝子を発現させたたんぱく質が、それぞれ  $\Delta 6$  不飽和化、 $\Delta 5$  不飽和化及び  $\Delta 6$  鎖長延長の酵素活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

【0017】

(1) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA の全部又は一部、あるいは当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA の全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。

## 【0018】

(2)  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 1 に示される塩基配列を有する遺伝子。(b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

## 【0019】

(3)  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち、253 ないし 1698 番目の塩基配列を有する遺伝子。(b) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち、253 ないし 1698 番目の塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

## 【0020】

(4)  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の 1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

## 【0021】

(5) 配列番号 3 に示される塩基配列からなる DNA の全部又は一部、あるいは当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA の全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。

## 【0022】

(6)  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 3 に示される塩基配列を有する遺伝子。(b) 配列番号 3 に示される塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

## 【0023】

(7)  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち、194 ないし 1066 番目の塩基配列を有する遺伝子。(b) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち、194 ないし 1066 番目の塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

## 【0024】

(8)  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質、(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の 1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

## 【0025】

(9) 配列番号 5 に示される塩基配列からなる DNA の全部又は一部、あるいは当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA の全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\Delta 5$  脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。

## 【0026】

(10)  $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 5 に示される塩基配列を有する遺伝子。(b) 配列番号 5 に示す塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

## 【0027】

(11)  $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 5 に示される塩基配列のうち、375 ないし 1829 番目の塩基配列を有する遺伝子。(b) 配列番号 5 に示される塩基配列のうち、375 ないし 1829 番目の塩基配列からなる DNA、又は当該 DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0028】

(12)  $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質、(b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列の 1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【0029】

(13) 上記 (1) ~ (12) の何れかに記載の遺伝子によってコードされるたんぱく質。

【0030】

(14) 以下の (a) 又は (b) 記載のたんぱく質。(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質。

【0031】

(15) 以下の (a) 又は (b) 記載のたんぱく質。(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質。

【0032】

(16) 以下の (a) 又は (b) 記載のたんぱく質。(a) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。(b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質。

【0033】

(17) 上記 (13) ~ (16) の何れかに記載のたんぱく質を認識する抗体。

【0034】

(18) 少なくとも上記 (1) ~ (12) の何れかに記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【0035】

(19) 少なくとも上記 (1) ~ (12) の何れかに記載の遺伝子を導入してなる形質転換体。

【0036】

(20) 少なくとも上記 (1) ~ (12) の何れかに記載の遺伝子が発現可能に導入された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織。

【0037】

(21) 少なくとも上記 (1) ~ (12) の何れかに記載の遺伝子が発現可能に導入され、脂肪酸組成が改変された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織。

【0038】

(22) 上記 (20) 又は (21) に記載の植物体の繁殖材料。

【0039】

(23) 上記 (21) に記載の植物体又は植物体の組織を用いる脂肪酸生産方法。

**【0040】**

(24) 上記(23)に記載の脂肪酸生産方法により得られた、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、エイコサテトラエン酸、およびエイコサペンタエン酸から選択される少なくとも1つ含む素材。

**【0041】**

(25) 少なくとも(1)～(12)の何れかに記載の遺伝子を用いて脂肪酸組成を改変する方法。

**【0042】**

(26) 上記(1)～(12)の何れかに記載の遺伝子における少なくとも一部の塩基配列又はその相補配列をプローブとして用いた遺伝子検出器具。

**【0043】**

(27) 上記(13)～(16)の何れかに記載のたんぱく質を用いて、当該たんぱく質を調節する遺伝子、又は当該たんぱく質を調節する物質をスクリーニングする方法。

**【0044】**

(28) 上記(27)に記載のスクリーニング方法により得られた遺伝子又は物質。

**【発明の効果】****【0045】**

本発明に係る遺伝子は、同一種のゼニゴケから単離された $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子及び $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子である。したがって、これら3種類の遺伝子を植物内で同時に発現させた場合に、異なる生物種由来の複数の遺伝子を発現させるより、植物内で良好に機能するという効果を奏する。さらに、ゼニゴケは、高等植物のモデル系と考えられるため、これらの遺伝子は、植物以外の生物種由来の遺伝子より植物内で良好に機能することができるという効果を奏する。

**【0046】**

また、本発明に係る形質転換体は、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸(EPA)等の高度不飽和脂肪酸を生産することができるという効果を奏する。特に、本発明に係る形質転換植物は、低コストかつ環境にやさしい生産プロセスでアラキドン酸やEPA等の高度不飽和脂肪酸を生産することができるという効果を奏する。こうして得られたアラキドン酸やEPAは、安価な多目的材料として活用できるという効果を奏する。さらに、上記形質転換植物体を食料として用いた場合、アラキドン酸やEPAの含量が高い食料としての価値が高まるという効果を奏する。

**【発明を実施するための最良の形態】****【0047】**

本発明の実施の一形態について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明は、これに限定されるものではない。

**【0048】**

以下、アラキドン酸及びエイコサペンタエン酸(EPA)の合成経路、本発明に係る遺伝子、本発明に係るたんぱく質、本発明に係るたんぱく質及び遺伝子の取得方法、並びに本発明に係る遺伝子及びたんぱく質の利用方法(有用性)の順で、本発明を詳細に説明する。

**【0049】**

(1) アラキドン酸及びエイコサペンタエン酸(EPA)の合成経路

アラキドン酸及びエイコサペンタエン酸(EPA)は、それぞれリノール酸及び $\alpha$ -リノレン酸を起点として、 $\Delta 6$ 不飽和化、 $\Delta 6$ 鎖長延長及び $\Delta 5$ 不飽和化という3つの連続した反応により、生合成されると考えられる。これらの反応は、それぞれ $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素により触媒され、それぞれ、 $n-6$ 経路(アラキドン酸合成経路)及び $n-3$ 経路(EPA合成経路)と呼ばれている。

**【0050】**

これまでに報告されている $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素は、いずれも $n-6$ 及び $n-3$ 経路の両方に関与していることが示されている。すなわ

ち、 $\Delta 6$  不飽和化酵素は、 $n-6$  経路ではリノール酸 ( $18:2\Delta^{9,12}$ 、18は炭素数を表し、2は二重結合の数を表し、9、12は二重結合の位置を表す。以下同様である。) を $g$ -リノレン酸 (GLA;  $18:3\Delta^{6,9,12}$ ) に変換し、 $n-3$  経路では $\alpha$ -リノレン酸 (ALA;  $18:3\Delta^{9,12,15}$ ) をステアリドン酸 (STA;  $18:4\Delta^{6,9,12,15}$ ) に変換する。 $\Delta 6$  鎖長延長酵素は、 $n-6$  経路ではGLAをジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (DGLA;  $20:3\Delta^{8,11,14}$ ) に変換し、 $n-3$  経路ではSTAをエイコサテトラエン酸 (ETA;  $20:4\Delta^{8,11,14,17}$ ) に変換する。 $\Delta 5$  不飽和化酵素は、 $n-6$  経路ではDGLAをアラキドン酸 ( $20:4\Delta^{5,8,11,14}$ ) に、 $n-3$  経路ではETAをエイコサペンタエン酸 (EPA;  $20:5\Delta^{5,8,11,14,17}$ ) に変換する。

【0051】

(2) 本発明に係る遺伝子

[本発明に係る $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子]

本発明に係る $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子は、 $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子であり、以下の条件に適合する遺伝子であればよい。

【0052】

1. 配列番号1に示される塩基配列を有する遺伝子。

【0053】

2. 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0054】

3. 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAの一部、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0055】

4. 配列番号1に示される塩基配列のうち、253ないし1698番目の塩基配列を有する遺伝子。なお、配列番号1に示される塩基配列の253ないし1698番目の塩基配列は配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質に翻訳される領域である。

【0056】

5. 配列番号1に示される塩基配列のうち、253ないし1698番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0057】

6. 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【0058】

7. 配列番号2に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【0059】

[本発明に係る $\Delta 6$  鎖長延長酵素遺伝子]

本発明に係る $\Delta 6$  鎖長延長酵素遺伝子は、 $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子であり、以下の条件に適合する遺伝子であればよい。

【0060】

1. 配列番号3に示される塩基配列を有する遺伝子。

【0061】

2. 配列番号3に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0062】

3. 配列番号3に示される塩基配列からなるDNAの一部、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0063】

4. 配列番号3に示される塩基配列のうち、194ないし1066番目の塩基配列を有

する遺伝子。なお、配列番号3に示される塩基配列の194ないし1066番目の塩基配列は配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質に翻訳される領域である。

【0064】

5. 配列番号3に示される塩基配列のうち、194ないし1066番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0065】

6. 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【0066】

7. 配列番号4に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【0067】

〔本発明に係る $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子〕

本発明に係る $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子は、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子であり、以下の条件に適合する遺伝子であればよい。

【0068】

1. 配列番号5に示される塩基配列を有する遺伝子。

【0069】

2. 配列番号5に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0070】

3. 配列番号5に示される塩基配列からなるDNAの一部、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0071】

4. 配列番号5に示される塩基配列のうち、375ないし1829番目の塩基配列を有する遺伝子。なお、配列番号5に示される塩基配列の375ないし1829番目の塩基配列は配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質に翻訳される領域である。

【0072】

5. 配列番号5に示される塩基配列のうち、375ないし1829番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

【0073】

6. 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【0074】

7. 配列番号6に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

【0075】

なお、上記「ストリンジェントな条件」とは、少なくとも90%の同一性、好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97%の同一性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。

【0076】

上記ハイブリダイゼーションは、J.Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載されている方法等、従来公知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなり（ハイブリダイズし難くなる）、より相同な遺伝子を取得することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、従来公知の条件を好適に用いることができ、特に限定しないが、例えば、42℃、6×SSPC、50%ホルムアミド、1%SDS、100 $\mu$ g/ml salmon sperm DNA、5×デンハルト液（ただし、1×SSPE；0.18M 塩化ナトリウム、10mM リン酸ナトリウム、pH 7.7、1mM EDTA）。

TA) が挙げられる。

【0077】

上記「ゼニゴケ目生物」とは、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) に限定されるものではなく、ゼニゴケ亜綱ゼニゴケ目 (*Marchantiales*) に属する生物が含まれる。これらのうち、*Monoclea forsteri* (*Monocleales*)、*Corsinia coriandrina* (*Marchantiales*)、*Oximitra paleacea* (*Marchantiales*)、*Ricciocarpos natans* (*Marchantiales*)、*Ricca huebneriana* (*Marchantiales*)、*Ricca fluitans* (*Marchantiales*)、*Ricca duplex* (*Marchantiales*)、*Ricca canaliculata* (*Marchantiales*)、*Ricca bifurca* (*Marchantiales*)、*Ricca ciliifera* (*Marchantiales*)、*Ricca glauca* (*Marchantiales*)、*Ricca sorocarpa* (*Marchantiales*)、*Ricca warnstorffii* (*Marchantiales*)、*Ricca michelii* (*Marchantiales*)、*Ricca papillosa* (*Marchantiales*) 及び *Ricca zachariae* (*Marchantiales*) には、超長鎖長高度不飽和脂肪酸が存在することが知られている (Prog. Lipid Res. 32, p281, 1993 参照)。これらの生物から  $\Delta 6$  不飽和化酵素、 $\Delta 6$  鎖長延長酵素及び  $\Delta 5$  不飽和化酵素の遺伝子を取得することは現在の技術水準を持ってすれば容易である。例えば、近縁生物の同じ機能を有する酵素をコードする遺伝子は、クロスハイブリダイゼーションすることが一般に知られている。

【0078】

本発明の遺伝子は、2 本鎖 DNA のみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖といった各 1 本鎖 DNA や RNA を包含する。アンチセンス鎖は、プローブとして又はアンチセンス化合物として利用できる。DNA には、例えばクローニングや化学合成技術又はそれらの組み合わせで得られるような cDNA やゲノム DNA などが含まれる。さらに、本発明の遺伝子は、非翻訳領域 (UTR) の配列やベクター配列 (発現ベクター配列を含む) などの配列を含むものであってもよい。

【0079】

(3) 本発明に係るたんぱく質

[本発明に係る  $\Delta 6$  不飽和化酵素たんぱく質]

本発明に係る  $\Delta 6$  不飽和化酵素たんぱく質は、ゼニゴケ目生物由来のたんぱく質であって  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質であればよい。より具体的には、以下に示すたんぱく質であればよい。

【0080】

1. 上記 (2) に記載した本発明に係る  $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子によってコードされるたんぱく質。

【0081】

2. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質

3. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の 1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質

[本発明に係る  $\Delta 6$  鎖長延長酵素たんぱく質]

本発明に係る  $\Delta 6$  鎖長延長酵素たんぱく質は、ゼニゴケ目生物由来のたんぱく質であって  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質であればよい。より具体的には、以下に示すたんぱく質であればよい。

【0082】

1. 上記 (2) に記載した本発明に係る  $\Delta 6$  鎖長延長酵素遺伝子によってコードされるたんぱく質。

【0083】

2. 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質

3. 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の 1 個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質

[本発明に係る  $\Delta 5$  不飽和化酵素たんぱく質]

本発明に係る  $\Delta 5$  不飽和化酵素たんぱく質は、ゼニゴケ目生物由来のたんぱく質であって  $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質であればよい。より具体的には、以下に示

すたんぱく質であればよい。

【0084】

1. 上記(2)に記載した本発明に係る $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子によってコードされるたんぱく質。

【0085】

2. 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質

3. 配列番号6に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質

上記「 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性」とは、リノール酸又は $\alpha$ -リノレン酸に対して基質特異性を有し、それぞれ $\gamma$ -リノレン酸又はステアリドン酸に変換する作用を意味する。また、上記「 $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長活性」とは、 $\gamma$ -リノレン酸又はステアリドン酸に対して基質特異性を有し、それぞれジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はエイコサテトラエン酸に変換する作用を意味する。また、上記「 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性」とは、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はエイコサテトラエン酸に対して基質特異性を有し、それぞれアラキドン酸又はエイコサペンタエン酸(EPA)に変換する作用を意味する。

【0086】

上記「1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異たんぱく質作製法により置換、欠失、挿入、及び／又は付加できる程度の数(好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、さらに好ましくは5個以下)のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されることを意味する。このような変異たんぱく質は、公知の変異たんぱく質作製法により人為的に導入された変異を有するたんぱく質に限定されるものではなく、天然に存在する同様の変異たんぱく質を単離精製したものであってもよい。

【0087】

なお、本発明のたんぱく質は、アミノ酸がペプチド結合してなるポリペプチドであればよいが、これに限定されるものではなく、ポリペプチド以外の構造を含む複合たんぱく質であってもよい。ここでいうポリペプチド以外の構造としては、糖鎖やイソプレノイド基等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

【0088】

また、本発明のたんぱく質は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、HisやMyc、Flag等によって本発明のたんぱく質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

【0089】

また、本発明のたんぱく質は、前述した本発明の遺伝子(本発明のたんぱく質をコードする遺伝子)を宿主細胞に導入して、そのたんぱく質を細胞内発現させた状態であってもよいし、細胞、組織などから単離精製された状態であってもよい。また、上記宿主細胞での発現条件によっては、本発明のたんぱく質は、他のたんぱく質とつながった融合たんぱく質であってもよい。さらに本発明のたんぱく質は、化学合成されたものであってもよい。

【0090】

(4) 本発明に係るたんぱく質及び遺伝子の取得方法

本発明に係るたんぱく質及び遺伝子の取得方法(生産方法)は特に限定されるものではないが、代表的な方法として次に示す各方法を挙げることができる。

【0091】

[たんぱく質の取得方法]

本発明のたんぱく質を取得する方法(生産方法)は、上述したように特に限定されるものではないが、まず、本発明のたんぱく質を発現する細胞、組織などから単純精製する方法を挙げることができる。精製方法も特に限定されるものではなく、公知の方法で細胞や組織から細胞抽出液を調製し、この細胞抽出液を公知の方法、例えばカラム等を用いて精製すればよい。

## 【0092】

また、本発明のたんぱく質を取得する方法として、遺伝子組み換え技術等を用いる方法も挙げられる。この場合、例えば、本発明の遺伝子をベクターなどに組み込んだ後、公知の方法により発現可能に宿主細胞に導入し、細胞内で翻訳されて得られる上記たんぱく質を精製するという方法などを採用することができる。

## 【0093】

なお、このように宿主に外来遺伝子を導入する場合、外来遺伝子の発現のため宿主内で機能するプロモーターを組み入れた発現ベクター及び宿主には様々なものが存在するので、目的に応じたものを選択すればよい。産生されたたんぱく質を精製する方法は、用いた宿主、たんぱく質の性質によって異なるが、タグの利用等によって比較的容易に目的のたんぱく質を精製することが可能である。

## 【0094】

変異たんぱく質を作製する方法についても、特に限定されるものではない。例えば、部位特異的突然変異誘発法 (Hashimoto - Gotoh, Gene 152, 271 - 275 (1995) 他)、PCR法を利用して塩基配列に点変異を導入し変異たんぱく質を作製する方法、あるいはトランスポゾンの挿入による突然変異株作製法などの周知の変異たんぱく質作製法を用いることができる。変異たんぱく質の作製には市販のキットを利用してもよい。

## 【0095】

本発明のたんぱく質の取得方法は上述の方法限定されることはなく、例えば、化学合成されたものであってもよい。例えば、無細胞系のたんぱく質合成液を利用して本発明の遺伝子から本発明のたんぱく質を合成してもよい。

## 【0096】

〔遺伝子の取得方法〕

本発明の遺伝子を取得する方法（生産方法）も特に限定されるものではないが、例えば、ディファレンシャルスクリーニング（サブトラクショナルクロニング）を利用する方法を挙げることができる。この方法では、公知の技術に従って、試験管内での直接的ハイブリダイゼーションを繰り返し、目的のcDNA（本発明の遺伝子）を濃縮すればよい。

## 【0097】

上記ディファレンシャルスクリーニングにおける各ステップについては、通常用いられる条件の下で行えばよい。これによって得られたクローンは、制限酵素地図の作成及びその塩基配列決定（シーケンシング）によって、さらに詳しく解析することができる。これらの解析によって、本発明の遺伝子配列を含むDNA断片を取得したか容易に確認することができる。

## 【0098】

また、本発明の遺伝子を取得する方法として、公知の技術により、本発明の遺伝子を含むDNA断片を単離し、クローニングする方法が挙げられる。例えば、本発明の遺伝子の塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーをスクリーニングすればよい。このようなプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列又はその相補配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブであれば、いずれの配列・長さのものを用いてもよい。

## 【0099】

また、上記プローブの配列を、上述したゼニゴケ間で良好に保存されている領域の中から選択し、他のゼニゴケのゲノムDNA（又はcDNA）ライブラリーをスクリーニングすれば、上記たんぱく質と同様の機能を有する相同分子や類縁分子をコードする遺伝子を単離しクローニングできる。

## 【0100】

あるいは、本発明の遺伝子を取得する方法として、PCR等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、本発明の遺伝子のcDNA配列のうち、5'側及び3'側の配列（又はその相補配列）の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムDNA（又はcDNA）等を鋳型にしてPCR等を行い、両プライマー間に挟

まれるDNA領域を増幅することで、本発明の遺伝子を含むDNA断片を大量に取得できる。

#### 【0101】

(5) 本発明に係る遺伝子及びたんぱく質の利用方法 (有用性)

##### (5-1) 組換え発現ベクター

本発明に係る組換え発現ベクターは、前記(2)に記載した本発明に係る遺伝子を含むものであれば、特に限定されるものではない。例えば、cDNAが挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどを用いることができるが特に限定されるものではない。また、作製方法も公知の方法を用いて行えばよい。

#### 【0102】

ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に遺伝子を発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明の遺伝子を各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。

#### 【0103】

本発明の遺伝子が宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認するために、各種マーカーを用いてもよい。例えば、宿主細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと本発明の遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。あるいは、本発明のたんぱく質を融合たんぱく質として発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光たんぱく質GFP (Green Fluorescent Protein) をマーカーとして用い、本発明のたんぱく質をGFP融合たんぱく質として発現させてもよい。

#### 【0104】

上記宿主細胞は、特に限定されるものではなく、従来公知の各種細胞を好適に用いることができる。具体的には、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

#### 【0105】

上記発現ベクターを宿主細胞に導入する方法、すなわち形質転換方法も特に限定されるものではなく、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。また、例えば、本発明のたんぱく質を昆虫で転移発現させる場合には、バキュロウイルスを用いた発現系を採用することができる。

#### 【0106】

##### (5-2) 形質転換体

本発明に係る形質転換体は、前記(2)に記載した本発明に係る遺伝子導入された形質転換体であれば、特に限定されるものではない。ここで「形質転換体」とは、細胞・組織・器官のみならず、生物個体を含む意味である。

#### 【0107】

形質転換体の作製方法 (生産方法) は特に限定されるものではないが、例えば、上述した組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換する方法を挙げることができる。また、形質転換の対象となる生物も特に限定されるものではなく、上記宿主細胞で例示した各種微生物や動物を挙げることができる。

#### 【0108】

本発明に係る形質転換体は、本発明に係る遺伝子が発現可能に導入された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織の組織であることが好ましい。このような形質転換植物により、低コストかつ環境に

やさしい生産プロセスでアラキドン酸やEPA等の高度不飽和脂肪酸を生産することができる。

#### 【0109】

ここで「遺伝子が発現可能に導入された」とは、公知の遺伝子工学的手法（遺伝子操作技術）により、対象細胞（宿主細胞）内に発現可能に導入されることを意味する。

#### 【0110】

植物体の形質転換に用いられる組換え発現ベクターは、当該植物細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば特に限定しない。例えば、植物細胞内で恒常的に遺伝子を発現させるプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター）を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることができる。なお、この植物細胞には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

#### 【0111】

植物細胞への組み換え発現ベクターの導入には、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など、当業者に公知の種々の方法を用いることができる。形質転換細胞から植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。

#### 【0112】

例えば、イネにおいて形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールを用いてプロトプラストへ遺伝子を導入し、植物体に再生させる方法、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体を再生させる方法、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法など、いくつかの技術が既に確立されている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

#### 【0113】

上記形質転換植物体がイネである場合、イネ内のアラキドン酸やEPAの含量が増加するので、この形質転換植物体から得られる種子、すなわち、米を食べることで、容易にアラキドン酸やEPA等の高度不飽和脂肪酸を、体内に摂取することが可能になる。したがって、イネの形質転換植物体は、食糧としての価値が高く、食品産業、農業分野に極めて有用である。また、現在あまり利用されていない米ぬか、モミガラ、ヒコバエ等でアラキドン酸やEPAを生産すれば、ここからこれら脂肪酸を抽出することにより、健康食品の原料として有効利用できる。また、家畜の飼料としても利用できる。

#### 【0114】

ゲノム内に本発明の遺伝子が導入された形質転換植物体がいったん得られれば、当該植物体から有性生殖又は無性生殖により子孫を得ることができる。また、当該植物体、又は、その子孫、あるいは、クローンから、繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラストなど）を得て、それらを基に当該植物体を量産することも可能である。したがって、本発明には、本発明の遺伝子が発現可能に導入された植物体、もしくは、当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は、当該植物体の組織、あるいは、当該植物体の繁殖材料も含まれる。

#### 【0115】

さらに、本発明に係る遺伝子が発現可能に導入され、脂肪酸組成が改変された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織、当該植物体の繁殖材料も本発明に含まれる。「脂肪酸組成が改変された」とは形質転換前の植物体における脂肪酸組成と形質転換後における植物体の脂肪酸組成が異なっていることを意味する。例えば、本来脂肪酸組成にアラキドン酸やEPAが含まれていなかった植物を本発明に係る遺伝子で形質転換することにより、形質転換植物の脂肪酸組成にアラキドン酸やEPAが含まれる場合等を挙げることができる。

#### 【0116】

##### （5-3）脂肪酸生産方法

本発明には、本発明に係る遺伝子で形質転換され、脂肪酸組成が改変された植物体又は

植物体の組織を用いて脂肪酸を生産する方法が含まれる。

【0117】

例えば、上述のようにアラキドン酸やEPAの含量が増加した本発明に係る形質転換植物から製造された食用油はアラキドン酸やEPAの含量が高く、価値の高いものになる。上記形質転換植物体の種子、果実、切穂、塊茎、塊根等も、アラキドン酸やEPAを含む食料として価値の高いものになる。

【0118】

(5-4) 素材

本発明には、上述の脂肪酸生産方法により得られた物質、すなわち、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸を少なくとも1つ含む素材も含まれる。この「素材」とは、上述の食料としての種子、果実、切穂、塊茎、又は、塊根の他に、工業原料用途に利用できる素材全般を意味する。

【0119】

上記素材としては、例えば、アラキドン酸やEPAを含む健康食品、フィルム、生分解性プラスチック、機能性繊維、潤滑油、洗剤の素材等が挙げられる。上記の不飽和脂肪酸は、分子内に二重結合を複数有するという、ユニークな物性を持つ。このため、例えば、本発明の形質転換植物体により、アラキドン酸やEPAを生産させることにより、生産コストを低減できる。また、本発明により、環境にやさしい生産プロセスを実現できる。

【0120】

(5-5) 脂肪酸組成改変方法

本発明には、本発明に係る遺伝子を用いて脂肪酸組成を改変する方法が含まれる。例えば、上述のように本発明に係る遺伝子を導入した形質転換体を作製することにより宿主細胞の脂肪酸組成を改変することが可能となる。脂肪酸組成を改変する対象は特に限定されるものではなく、植物以外にも動物、細菌、酵母等、あらゆる生物を対象とすることが可能である。

【0121】

(5-6) 遺伝子検出器具

本発明に係る遺伝子検出器具は、本発明に係る遺伝子の少なくとも一部の塩基配列又はその相補配列をプローブとして用いたものである。遺伝子検出器具は、種々の条件下において、本発明の遺伝子の発現パターンの検出・測定などに利用することができる。

【0122】

本発明の遺伝子検出器具としては、例えば、本発明の遺伝子と特異的にハイブリダイズする上記プローブを基盤（担体）上に固定化したDNAチップが挙げられる。ここで「DNAチップ」とは、主として、合成したオリゴヌクレオチドをプローブに用いる合成型DNAチップを意味するが、PCR産物などのcDNAをプローブに用いる貼り付け型DNAマイクロアレイをも包含するものとする。

【0123】

プローブとして用いる配列は、cDNA配列の中から特徴的な配列を特定する従来公知の方法によって決定することができる。具体的には、例えば、SAGE: Serial Analysis of Gene Expression法 (Science 276:1268, 1997; Cell 88:243, 1997; Science 270:484, 1995; Nature 389:300, 1997; 米国特許第5,695,937号) 等を挙げることができる。

【0124】

なお、DNAチップの製造には、公知の方法を採用すればよい。例えば、オリゴヌクレオチドとして合成オリゴヌクレオチドを使用する場合には、フォトリソグラフィ-技術と固相法DNA合成技術との組み合わせにより、基盤上で該オリゴヌクレオチドを合成すればよい。一方、オリゴヌクレオチドとしてcDNAを用いる場合には、アレイ機を用いて基盤上に貼り付ければよい。

【0125】

また、一般的なDNAチップと同様、パーフェクトマッチプローブ（オリゴヌクレオチ

ド) と、該パーフェクトマッチプローブにおいて一塩基置換されたミスマッチプローブとを配置して遺伝子の検出精度をより向上させてもよい。さらに、異なる遺伝子を並行して検出するために、複数種のオリゴヌクレオチドを同一の基盤上に固定してDNAチップを構成してもよい。

#### 【0126】

本発明に係る遺伝子検出器具は、上記例示したDNAチップに限定されるものではなく、本発明に係る遺伝子の少なくとも一部の塩基配列又はその相補配列をプローブとして用いたものであればよい。

#### 【0127】

##### (5-7) 抗体

本発明に係る抗体は、本発明に係るたんぱく質、又はその部分たんぱく質・部分ペプチドを抗原として、公知の方法によりポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体として得られる抗体である。公知の方法としては、例えば、文献 (Harlowらの「Antibodies: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1988))、岩崎らの「単クローン抗体 ハイブリドーマとELISA, 講談社(1991)」) に記載の方法が挙げられる。このようにして得られる抗体は、本発明のたんぱく質の検出・測定などに利用できる。

#### 【0128】

##### (5-8) スクリーニング方法

本発明に係るスクリーニング方法は、本発明に係るたんぱく質を用いて、当該たんぱく質を調節する遺伝子、又は当該たんぱく質を調節する物質をスクリーニングする方法である。本発明のスクリーニング方法としては、物質間の結合の有無や解離の有無を調べる従来公知の種々の方法を適用することができ、特に限定されるものではない。例えば、本発明に係るたんぱく質の活性 ( $\Delta 6$  不飽和化活性、 $\Delta 6$  鎖長延長活性及び/又は $\Delta 5$  不飽和化活性) を促進するような物質のスクリーニングを挙げることができる。

#### 【0129】

また、本発明には、上記スクリーニング方法により得られた遺伝子又は物質も含まれる。

#### 【0130】

以下にいくつかの実施例、並びに図面を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

#### 【実施例】

#### 【0131】

本実施例において、実験手法は、特に断らない限り、Molecular Cloning(Sambrook et al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989)に記載されている方法に従った。

##### 〔実施例1: ゼニゴケ由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子の単離〕

これまでにクローニングされた $\Delta 6$  不飽和化酵素のアミノ酸配列の比較により、アミノ酸配列 Trp - Trp - Lys - (Glu/Asp) - Lys - His - Asn (配列番号 37) 及び Trp - Phe - Thr - Gly - Gly - Leu - Asn (配列番号 38) が保存されていることがわかった。そこで、ゼニゴケ由来の $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子を単離するために、上記のアミノ酸配列をコードする下記の縮退プライマーを用いた。

d $\Delta 6$ DES - F 5' - TGGTGGAA(A/G)GA(A/G/T/C)AA(A/G)CA(T/C)AA - 3' (配列番号 7)

d $\Delta 6$ DES - R 5' - (A/G)TTIA(A/G)ICCIICIGT(A/G)AACCA - 3' (配列番号 8)

(Iはイノシン、()内は複数の塩基)

試料にはE系統ゼニゴケ (Transgenic Res. 9, p179, 2000参照) の葉状体を用いた。葉状体からのpoly(A)<sup>+</sup> RNAの単離については、文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p605, 2003; Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p1667, 2003) に記載の方法に従っ

た。単離したpoly(A)<sup>+</sup>RNA 1.5  $\mu$ lを、Ready-To-Go T-primed First Strand kit (Amersham社製)を用いてcDNAに逆転写した。PCRは、上記cDNA約10 ngを鋳型とし、上記プライマー (d $\Delta$ 6DES-F及びd $\Delta$ 6DES-R) 及び酵素 (Takara Ex Taq, Takara社製) 0.5 Uとを用いて、製造者の推奨する方法で行った。反応液量は20  $\mu$ lとし、GeneAmp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems社製)を用いて、94℃ 2分間保持後、94℃で1分間、45℃で1.5分間、72℃で2分間の反応を35回繰り返し、その後4℃に冷却した。

#### 【0132】

得られたPCR産物を1% (w/v) アガロ - スゲルで電気泳動し、従来の $\Delta$ 6不飽和化酵素のアミノ酸配列から予想されるサイズを有する増幅断片を、Prep-A Gene (Bio-rad社製)を用いてゲルより回収した。回収した増幅断片をpT7Blue Vector (Takara社製)に連結し、大腸菌Electro-max DH10B cells (Invitrogen社製, Carlsbad, CA)に形質転換した。

#### 【0133】

BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems社製) 及びautomated sequencer ABI PRISM 377 (Applied Biosystems社製)を用いて得られた全クローンの塩基配列を決定し、目的のcDNA配列をもつものを探索した。

#### 【0134】

さらに、全長cDNA配列を取得するために、5'-RACE及び3'-RACEを行った。これには、5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 (Invitrogen社製)、Ready-To-Go T-primed First Strand kit (Amersham社製) 及び下記のプライマー (MpDES6-02R及びMpDES6-01F)を用い、製造者の推奨する方法で行った。

MpDES6-02R: 5'-AAGTTGCCTTCGATGTTTCTGG-3' (配列番号9)

MpDES6-01F: 5'-GCTCGCCTGGAGCAAGGAAATC-3' (配列番号10)

その結果、1種類のホモログ遺伝子候補が単離され、この遺伝子をMpDES6遺伝子とした。単離されたMpDES6遺伝子のcDNAの長さ (ポリA部分を除く) は、2,522 bpであり、そのコードする推定アミノ酸配列は481残基であった。その塩基配列を配列番号1、アミノ酸配列を配列番号2に示した。

#### 【0135】

MpDES6 cDNAの推定アミノ酸配列をヒメツリガネゴケの $\Delta$ 6不飽和化酵素のアミノ酸配列と比較した結果、47.5%の同一性しか示さなかった。

【実施例2:ゼニゴケ由来の $\Delta$ 6鎖長延長酵素遺伝子の単離】

これまでにクローニングされた $\Delta$ 6鎖長延長酵素のアミノ酸配列の比較により、アミノ酸配列Val - Glu - Phe - Met - Asp - Thr - Val (配列番号39) 及び Lys - Tyr - Leu - Phe - Trp - Gly - Arg (配列番号40) が保存されていることがわかった。そこで、ゼニゴケ由来の $\Delta$ 6鎖長延長酵素遺伝子を単離するために、上記のアミノ酸配列をコードする下記の縮退プライマーを用いた。

d $\Delta$ 6ELO-F 5'-GTIGA(A/G)TT(T/C)ATGGA(T/C)ACIGT-3' (配列番号11)

d $\Delta$ 6ELO-R 5'-C(G/T)ICCCCA(A/G)AAIA(A/G)(A/G)TA(T/C)TT-3' (配列番号12)

上記のプライマー (d $\Delta$ 6ELO-F及びd $\Delta$ 6ELO-R)を用いてPCRを行い、得られたDNA断片をサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定し、目的のcDNA配列をもつクローンについて下記のプライマー (MpELO1-02R及びMpELO1-01F)を用いて完全長cDNAを取得した。なお、実験材料及び方法は、実施例1と同様である。

MpELO1-02R: 5'-GCGAGCTTCTCGTTCTTTCCC-3' (配列番号13)

MpELO1-01F: 5'-TATGATTTTGAAGCGCAACACG-3' (配列番号14)

その結果、1種類のホモログ遺伝子候補が単離され、この遺伝子をMpELO1遺伝子とした。MpELO1遺伝子のcDNAの長さ (ポリA部分を除く) は、1,559 bpで、推定アミノ酸配列は290残基であった。その塩基配列を配列番号3、アミノ酸配列を配列番号4に示した。

#### 【0136】

MpELO1 cDNA の推定アミノ酸配列をヒメツリガネゴケの  $\Delta 6$  鎖延長酵素のアミノ酸配列と比較した結果、同一性は 62.7% であった。

〔実施例 3: ゼニゴケ由来の  $\Delta 5$  不飽和化酵素遺伝子の単離〕

他生物種の  $\Delta 5$  不飽和化酵素は、その N 末端にシトクロム b5 ドメインを有する。このことから、ゼニゴケ由来の  $\Delta 5$  不飽和化酵素遺伝子は、 $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子と同じく、シトクロム b5 ドメイン融合型不飽和化酵素遺伝子ファミリーに属することが予想された。しかしながら、ケイ藻や真菌においては、 $\Delta 5$  不飽和化酵素及び  $\Delta 6$  不飽和化酵素間のアミノ酸配列レベルでの相同性は非常に低い。そこで、糸状菌 (*M. alpina*) の  $\Delta 5$  不飽和化酵素及び  $\Delta 6$  不飽和化酵素間のアミノ酸配列を比較した結果、縮退プライマー設計に最低限必要な 4 から 5 残基程度の連続した保存配列が局所的に存在することを見出した。驚くべきことに、これらの保存配列は、異種の  $\Delta 5$  不飽和化酵素のアミノ酸配列間より、同種内の  $\Delta 5$  不飽和化酵素と  $\Delta 6$  不飽和化酵素との間で、より保存されていることを見出した。このことから、シトクロム b5 ドメイン融合型不飽和化酵素遺伝子には、種特異的な保存配列が存在する場合があると考えられた。そこで、上述の MpDES6 と、Genetics 159, p981, 2001 に記載されている機能未知の MpDES とで、塩基配列を鋭意比較検討した結果、2 箇所のアミノ酸配列 (I(E/N)(G/D)KVYDV (配列番号 41)、及び、DPDI(Q/D)(Y/T)(M/V)P (配列番号 42)) のアミノ酸配列が保存されていることを見出した。それぞれのアミノ酸配列に対応する縮退プライマーの配列を次に示す。

d $\Delta 5$ DES-F 5' - AT(A/T/C)(A/G)AIG(A/G)IAA(A/G)TITA(T/C)GA(T/C)GT-3' (配列番号 15)

d $\Delta 5$ DES-R 5' - GGIA(T/C)I(G/T)(A/T)IT(G/C)(A/G/T)AT(A/G)TCIGG(A/G)TC-3' (配列番号 16)

上記プライマー (d $\Delta 5$ DES-F 及び d $\Delta 5$ DES-R) を用いて PCR をい、得られた DNA 断片をサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定し、目的の cDNA 配列をもつクローンについて下記のプライマー (MpDES5-02R 及び MpDES5-01F) を用いて完全長 cDNA を取得した。なお、実験材料及び方法は、実施例 1 と同様である。

MpDES5-02R: 5' - GTGTGTACGATCCGTGGTTACC-3' (配列番号 17)

MpDES5-01F: 5' - AAGGCGGGACAGGATTCAACAC-3' (配列番号 18)

その結果、ゼニゴケ由来の  $\Delta 5$  不飽和化酵素の候補として、2 種類の長さの異なるクローン c1 及び c2 を単離した (c1: 2, 427 bp、c2: 2, 285 bp)。c1 と c2 との塩基配列を比較したところ、5' 非翻訳領域で、オルタナティブ・スプライシング (選択的スプライシング) が起こっていることが明らかとなった。オルタナティブ・スプライシングによる読み枠の変化はなく、いずれのクローンも 484 個のアミノ酸をコードしていた (配列番号 6)。以下、2, 427 bp の長さのクローン c1 を MpDES5 遺伝子 (配列番号 5) とし、以下の実施例に用いた。

#### 【0137】

MpDES5 cDNA の推定アミノ酸配列を糸状菌 (*M. alpina*) の  $\Delta 5$  不飽和化酵素のアミノ酸配列と比較した結果、31.4% の同一性であった。ゼニゴケと近縁なヒメツリガネゴケの  $\Delta 5$  不飽和化酵素に関しては、配列情報が公表されていないため、ここでは比較を行わなかった。

〔実施例 4: メタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) を用いた機能解析〕

MpDES6、MpELO1 及び MpDES5 の cDNA の機能を調べるために、まず個々の ORF を、メタノール誘導性プロモーター AOX1 の下流に配置したコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトをメタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) に導入し、その脂肪酸組成を解析した。MpDES6、MpELO1、及び、MpDES5 の cDNA 塩基配列の ORF 部分を、下記のプライマーを用いて、PCR により増幅した。

(MpDES6 ORF 増幅用プライマー)

MpD6-17F: 5' - GGAATTCGCGATGGCCTCGTCCACCACCAC-3' (配列番号 19)

MpD6-18F: 5' - GGAATTCTACTTTCGACGCTATGCTACC-3' (配列番号 20)

(MpELO1ORF増幅用プライマー)

MpD6EL01 - 15F: 5' - GGAATTCGCGATGGAGGCGTACGAGATGG - 3' (配列番号 21)

MpD6EL01 - 16F: 5' - GGAATTCTTCTGCCTTTTGTCTTGTATC - 3' (配列番号 22)

(MpDES5ORF増幅用プライマー)

MpD5 - 11F: 5' - GTTGAATTCGACAGTTATGCCGCCACACGC - 3' (配列番号 23)

MpD5 - 12R: 5' - GTTGAATTCAGGCCCAAAGCATGCTGTCAC - 3' (配列番号 24)

これらのプライマーは、下線で示したEcoRI認識配列を含んでおり、これを以下のクローニングに利用した。また、PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5 Uを用い、製造者の推奨する方法に従って反応液量20 $\mu$ lで行った。反応条件は、94 $^{\circ}$ Cで2分間保持後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、57 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間の反応を25回繰り返し、その後4 $^{\circ}$ Cに冷却した。得られた各ORF断片をEcoRIで消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行った。そして、メタノール資化性酵母の発現ベクターpPICZA (マーカー: ゼオシン耐性遺伝子, Invitrogen社製) 内のメタノール誘導性プロモーター5' AOX1下流のEcoRI部位にセンス方向に連結した。

#### 【0138】

各々の発現コンストラクト及び対照としてのpPICZAベクターを、Pichia EasyComp kit (Invitrogen社製) を用いてメタノール資化性酵母のPPY1系統に導入し、ゼオシン耐性をマーカーとして形質転換体を取得した。なお、メタノール資化性酵母は、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素の基質であるリノール酸と $\alpha$ -リノレン酸を合成することができるが、アラキドン酸やEPAのその他の前駆体を合成することはできない。

#### 【0139】

導入した遺伝子を発現させるため、EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen社製) を用い、当該キットの推奨する方法に従って、各形質転換体を1.0%グリセロールのみを炭素源とする最小培地中でOD (600nm)が0.5になるまで培養した後、0.5%メタノールのみを炭素源とする最小培地中で30 $^{\circ}$ C、3日間、飽和状態になるまで培養した。その後、各々の形質転換体の脂肪酸組成を、GC-MSを用いて公知の方法 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p605, 2003) により測定した。

#### 【0140】

MpDES6遺伝子を発現させた形質転換体では、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素の反応産物であるg-リノレン酸及びステアリドン酸が、全脂肪酸のそれぞれ7.4%及び0.7%新たに検出された。対照としてpPICZAベクターを導入した酵母ではこれらは検出されなかった。以上のことから、MpDES6は $\Delta 6$ 不飽和化酵素をコードしていることが示された。

#### 【0141】

MpELO1遺伝子を発現させた形質転換体では、g-リノレン酸を添加した場合にジホモ-g-リノレン酸が全脂肪酸の14.1%、ステアリドン酸を添加した場合にエイコサテトラエン酸が1.5%新たに検出された。対照としてpPICZAベクターを導入した酵母では、これらは検出されなかった。以上のことから、MpELO1は $\Delta 6$ 鎖長延長酵素をコードしていることが示された。

#### 【0142】

MpDES5遺伝子を発現させた形質転換体では、ジホモ-g-リノレン酸を添加した場合にアラキドン酸が全脂肪酸の1.1%、ステアリドン酸を添加した場合にエイコサペンタエン酸 (EPA) が0.1%検出された。対照としてpPICZAベクターを導入した酵母ではこれらは検出されなかった。以上から、MpDES5は、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素をコードすることが示された。

#### 【0143】

以上のようにゼニゴケから、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素をコードする遺伝子として、それぞれMpDES6、MpELO1及びMpDES5を取得することができた。

[実施例5: メタノール資化性酵母 (P. pastoris) におけるゼニゴケ高度不飽和脂肪酸生合成系の再構成]

MpDES6、MpELO1及びMpDES5を共発現させるために、上記実施例4で作製した、EcoRI消化したMpELO1及びMpDES5のORF増幅断片を、各々別のメタノール資化性酵母発現ベクター pPIC3K（マーカー：HIS4遺伝子、Invitrogen社製社）及びpPIC6A（マーカー：ブラスチジン耐性遺伝子、Invitrogen社製社）の5' AOX1プロモーター下流のEcoRI部位にセンス方向に連結した。また、MpDES6に関しては、実施例4で作製した発現ベクターを用いた。以下各発現ベクターを、それぞれpPICZA-MpDES6、pPIC3K-MpELO1及びpPIC6A-MpDES5と表記する。

#### 【0144】

まず、pPICZA-MpDES6、又は、対照としてのpPICZAベクターのみを、上記実施例4で用いたメタノール資化性酵母PPY1系統と同じ脂肪酸組成を持つメタノール資化性酵母PPY12系統（his4, arg4）に形質転換し、ゼオシン耐性をマーカーにして形質転換体を取得した。続いて、pPIC3K-MpELO1、又は、対照としてのpPIC3Kベクターのみを、それぞれ、pPICZA-MpDES6、又はpPICZAのみがゲノム中に組み込まれた形質転換体に導入し、ヒスチジン合成能をマーカーにして形質転換体を取得した。最後に、pPIC6A-MpDES5、又は、対照としてのpPIC6Aベクターのみを、pPICZA-MpDES6及びpPIC3K-MpELO1又はpPICZA及びpPIC3Kがゲノム中に組み込まれた上記形質転換体に導入し、ブラスチジン耐性をマーカーとして形質転換体を取得した。

#### 【0145】

得られた2種類又は3種類の遺伝子が導入された形質転換体を用いて、ゼニゴケのアラキドン酸／EPA生合成系の再構成実験を行った。まず、上記2種類の遺伝子（MpDES6及びMpELO1）を導入した。形質転換体を用いて、MpDES6たんぱく質及びMpELO1たんぱく質をメタノール資化性酵母内で共発現させた。その結果、 $\Delta 6$ 不飽和化反応産物であるg-リノレン酸（全脂肪酸の2.9%）及びステアリドン酸（全脂肪酸の0.4%）に加え、それらの鎖長延長反応産物であるジホモ-g-リノレン酸（全脂肪酸の2.8%）及びエイコサテトラエン酸（全脂肪酸の0.2%）が生じた。対照とした形質転換体では、これらの脂肪酸は検出されなかった。上記形質転換体に、さらにMpDES5を導入した形質転換体では、g-リノレン酸（全脂肪酸の2.8%）、ステアリドン酸（全脂肪酸の0.5%）、ジホモ-g-リノレン酸（全脂肪酸の1.5%）及びエイコサテトラエン酸（全脂肪酸の0.1%）の4種の脂肪酸に加えて、アラキドン酸（全脂肪酸の0.1%）及びエイコサペンタエン酸（EPA、全脂肪酸の0.03%）の生成が認められた。対照とした形質転換体では、これらの脂肪酸は検出されなかった。この結果から、ゼニゴケ由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素の遺伝子を発現させることで、ゼニゴケ以外の生物種においても、高度不飽和脂肪酸生合成系の再構築が可能であることが示された。

〔実施例6：イネに導入するベクターの構築及び当該ベクターのイネへの導入〕

イネにおいて、MpDES6、MpELO1及びMpDES5遺伝子を発現させるために、以下の(i)～(iv)に示す手順で発現コンストラクトを作製した。また、作製手順を図1に示した。

#### 【0146】

(i)pBI221（TOYOBO社製）のカリフラワ-モザイクウイルス（CaMV）35Sプロモーター、及び、NOSターミネーター間に設計した以下のプライマーを用いたPCRにより、 $\beta$ -Glucuronidase（GUS）遺伝子部分を除いた発現ベクターp35S-NOSを作製した。

MK001(F): 5' - CGGGATCCTCTCTGGCGCACCATCGTC - 3' （配列番号25）

MK002(R): 5' - GGGGTACCAACGCGCTTTCCACCAACG - 3' （配列番号26）

なお、プライマーMK001(F)は下線で示すBamHI認識配列を含み、GUS遺伝子の3'末端にアニールし、プライマーMK002(R)はGUS遺伝子の5'末端にアニールする（BamHIサイトがアニール部位の上流に存在する）。PCRにはPyrobest DNA polymerase（Takara社製）0.5 Uを用い、製造者の推奨する方法に従って反応液量50  $\mu$ lで行った。反応条件は、96℃5分間保持後、94℃で30秒間、68℃で4分間の反応を30回繰り返し、その後4℃に冷却した。得られた各ORF断片をBamHI消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行った後、自己連結させた。

## 【0147】

(ii)次にp35S - NOSのXbaIサイトに、MpDES6 遺伝子、MpELO1 遺伝子及びMpDES5 遺伝子のORFを各々連結した。ORF増幅には、下線で示すXbaI認識配列を含む以下のプライマーを用いた。

(MpDES6 ORF増幅用プライマー)

MpD6 - 21F: 5' - GCTCTAGAGCGATGGCCTCGTCCACCACC - 3' (配列番号 27)

MpD6 - 11R: 5' - GCTCTAGACTATACTTTTCGACGCGTATGC - 3' (配列番号 28)

(MpELO1 ORF増幅用プライマー)

MpD6ELO1 - 18F: 5' - GCTCTAGAGCGATGGAGGCGTACGAGATGG - 3' (配列番号 29)

MpD6ELO1 - 13R: 5' - GCTCTAGATTATTCTGCCTTTTGTCTC - 3' (配列番号 30)

(MpDES5 ORF増幅用プライマー)

MpD5 - 22F: 5' - GCTCTAGAGACAGTTATGCCGCCACACGC - 3' (配列番号 31)

MpD5 - 23R: 5' - GCTCTAGAAGGCCCAAAGCATGCTGTAC - 3' (配列番号 32)

PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5 Uを用い、製造者の推奨する方法に従って、反応液量 20  $\mu$  lで行った。反応条件は、94℃で2分間保持後、94℃で1分間、57℃で1分間、72℃で1分間の反応を25回繰り返し、その後4℃に冷却した。得られた各ORF断片をXbaIで消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行いクローニングに用いた。

## 【0148】

(iii)得られた各遺伝子の発現コンストラクト (それぞれをp35S-MpDES6、p35S-MpELO1、p35S-MpDES5と表記する) がいずれもCaMV35Sプロモーター5' 末端にPstIサイトを、NOSターミネーター3' 末端にEcoRIサイトを持つことを利用して、上記3遺伝子の発現カセットを連結した。まず、以下に示すプライマーを用いてp35S-MpDES5を鋳型としてPCRを行い、MpDES5 遺伝子の発現カセット部分を増幅し、p35S-MpDES6のCaMV35Sプロモーター5' 末端にあるPstIサイトにクローニングした(図1参照)。

(MpDES5 遺伝子発現カセット増幅用プライマー)

M13R: 5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3' (配列番号 33)

NOS - R4 - PST: 5' - AAAGTGCAGATTCCTGATCTAGTAACATAG - 3' (配列番号 34)

なお、M13Rプライマーは、CaMV35Sプロモーター上流のベクター配列にアニールする。また、NOS - R4 - PSTプライマーは、下線で示すPstI認識配列を含み、NOSターミネーター3' 末端にアニールする。同じくNOSターミネーター3' 末端に存在するEcoRIサイトは含まない。

## 【0149】

PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5 Uを用い、製造者の推奨する方法に従って、反応液量 20  $\mu$  lで行った。反応条件は、94℃で2分間保持後、94℃で1分間、57℃で1分間、72℃で1分間の反応を25回繰り返し、その後4℃に冷却した。得られたDNA断片をPstIで消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行い、MpDES6 遺伝子の発現カセットを含むプラスミド (p35S-MpDES6) のPstIサイトにクローニングした。

## 【0150】

(iv)上記で得られた、MpDES5 及びMpDES6 遺伝子の発現カセットを連結させたコンストラクト (p35S-MpDES5/35S-MpDES6と表記する) に、さらにMpELO1 遺伝子の発現カセットを連結した。以下のプライマーを用いてp35S-MpELO1を鋳型としてPCRを行い、MpELO1 遺伝子の発現カセット部分を増幅し、MpDES6 遺伝子発現カセット内のNOSターミネーター3' 末端にあるEcoRIサイトにクローニングした。

(MpELO1 遺伝子発現カセット増幅用プライマー)

35S - F3 - EI: 5' - CCGGAATTCGCATGCCTGCAGGTCCCCAGA - 3' (配列番号 35)

M13F: 5' - TGTAACACGACGGCCAGT - 3' (配列番号 36)

なお、35S - F3 - EIプライマーは、下線で示すEcoRI認識配列を含み、CaMV35Sプロモーターの5' 末端にアニールする。また、M13FプライマーはNOSターミネーター下流のベクター

ー配列にアニールする。

【0151】

PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5 Uを用い、製造者の推奨する方法に従って、反応液量  $20\mu\text{l}$  で行った。反応条件は、 $94^{\circ}\text{C}$  で2分間保持後、 $94^{\circ}\text{C}$  で1分間、 $57^{\circ}\text{C}$  で1分間、 $72^{\circ}\text{C}$  で1分間の反応を25回繰り返し、その後  $4^{\circ}\text{C}$  に冷却した。得られたDNA断片をEcoRIで消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行い、MpDES5及びMpDES6遺伝子の発現カセットを連結させたコンストラクト (p35S-MpDES5/35S-MpDES6) のEcoRI部位にクローニングした。

【0152】

以上の操作により、3遺伝子の発現カセットが、MpDES5, MpDES6, MpELO1の順で連結した発現コンストラクト (p35S-MpDES5/35S-MpDES6/p35S-MpELO1) を作製した。

【0153】

このようにして得られた上記コンストラクトを、公知の方法 (Genes Genet. Syst. 73, p219, 1998) で、ピアラフォスを選抜マーカーとして持つプラスミドとともに、パーティクルガンでイネに導入し、形質転換イネを取得した。

【産業上の利用可能性】

【0154】

以上のように、本発明の遺伝子・たんぱく質は、アラキドン酸やEPAの生産に有用である。また、本発明の遺伝子を発現可能に導入した形質転換体は、製薬産業、食品産業、各種素材産業等において、アラキドン酸やEPAを生産するうえで、極めて有用である。また、特に、上記形質転換体が植物体である場合、植物体内のアラキドン酸やEPAの含量が増加するので、農業分野等において非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1】実施例6で用いたMpDES6遺伝子、MpELO1遺伝子及びMpDES5遺伝子の各遺伝子の発現カセットが連結されたコンストラクトの構築手順を示す説明図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Suntory Limited

&lt;120&gt; The unsaturated fatty acid synthesis genes in Marchantia polymorpha and the use of the genes

&lt;130&gt;

&lt;160&gt; 42

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2519

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Marchantia polymorpha

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (253)..(1698)

&lt;400&gt; 1

```

atagatccaa tttcataagt cgacgagaaa ggcagaaggc gagaagcggc aggcagcgag 60
cgcgagcgcc agagctcttg ctcccctcgc tcctcgctcg cattgccgca tttgtgagt 120
gtcggactga tcactcagtc cgtcactgca aacgcgagcg agcgagagtg cgagtgagcg 180
agcgagcgag cgagagccgc ggtgtgtctg tgagatccaa tcctttttct gctttgcgcg 240
ctgtggggcg cg atg gcc tcg tcc acc acc acc gcc gtg aag caa tct tcg 291
      Met Ala Ser Ser Thr Thr Thr Ala Val Lys Gln Ser Ser
              1              5              10

ggt ggg ctg tgg tcg aaa tgg ggc acc ggc agc aac ttg agc ttc gtg 339
Gly Gly Leu Trp Ser Lys Trp Gly Thr Gly Ser Asn Leu Ser Phe Val
      15              20              25

tcg cgc aag gag cag cag cag cag cag cag cag agc tct ccc gag gcg 387
Ser Arg Lys Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ser Ser Pro Glu Ala
      30              35              40              45

tcg act ccc gcg gcg cag cag gag aaa tcc atc agt aga gaa tcc atc 435
Ser Thr Pro Ala Ala Gln Gln Glu Lys Ser Ile Ser Arg Glu Ser Ile
              50              55              60

ccc gag ggc ttc ttg acc gtg gag gag gtg tcg aag cac gac aat ccg 483
Pro Glu Gly Phe Leu Thr Val Glu Glu Val Ser Lys His Asp Asn Pro

```

65	70	75	
agc gac tgc tgg atc gtc atc aac gac aag gtg tac gac gtg agc gca Ser Asp Cys Trp Ile Val Ile Asn Asp Lys Val Tyr Asp Val Ser Ala 80 85 90			531
ttc ggg aag acg cat ccg ggc ggc cct gtg atc ttc acg cag gcc ggc Phe Gly Lys Thr His Pro Gly Gly Pro Val Ile Phe Thr Gln Ala Gly 95 100 105			579
cgc gac gcc acg gat tct ttc aag gtt ttc cac tcc gcc aag gcg tgg Arg Asp Ala Thr Asp Ser Phe Lys Val Phe His Ser Ala Lys Ala Trp 110 115 120 125			627
cag ttt ctc cag gac ctg tac atc gga gat ctg tac aat gcc gag cca Gln Phe Leu Gln Asp Leu Tyr Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Ala Glu Pro 130 135 140			675
gtg tcg gag ctg gtg aag gat tac cga gac ctg agg acg gcg ttc atg Val Ser Glu Leu Val Lys Asp Tyr Arg Asp Leu Arg Thr Ala Phe Met 145 150 155			723
cgt tct cag cta ttc aag agc agt aaa atg tac tac gtg acc aag tgc Arg Ser Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Met Tyr Tyr Val Thr Lys Cys 160 165 170			771
gtc aca aat ttt gca att ctt gcc gcc agt ctc gca gtc atc gcg tgg Val Thr Asn Phe Ala Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Val Ile Ala Trp 175 180 185			819
agc cag acg tat ctg gcg gtt ttg tgc tcc agt ttc ctg ttg gct ctc Ser Gln Thr Tyr Leu Ala Val Leu Cys Ser Ser Phe Leu Leu Ala Leu 190 195 200 205			867
ttc tgg cag caa tgt gga tgg tta tcg cac gat ttt ctc cac cac cag Phe Trp Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln 210 215 220			915
gtg acc gag aac cga tcg ctc aac acg tac ttc ggc ggc ctg ttc tgg Val Thr Glu Asn Arg Ser Leu Asn Thr Tyr Phe Gly Gly Leu Phe Trp 225 230 235			963
ggt aac ttc gcc cag ggc tac agc gtg gga tgg tgg aag acc aag cac Gly Asn Phe Ala Gln Gly Tyr Ser Val Gly Trp Trp Lys Thr Lys His 240 245 250			1011
aat gtg cac cac gcg gcc acg aac gaa tgc gac gac aag tat cag ccc Asn Val His His Ala Ala Thr Asn Glu Cys Asp Asp Lys Tyr Gln Pro 255 260 265			1059

atc gat ccc gac atc gac acc gtg ccc ctg ctc gcc tgg agc aag gaa 1107  
 Ile Asp Pro Asp Ile Asp Thr Val Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu  
 270 275 280 285

atc ttg gcc acc gtc gac gac caa ttc ttc cga tcg atc atc agc gtg 1155  
 Ile Leu Ala Thr Val Asp Asp Gln Phe Phe Arg Ser Ile Ile Ser Val  
 290 295 300

cag cac ctt ctg ttc ttc ccg ctc ctc ttc ttg gca aga ttc agc tgg 1203  
 Gln His Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu Phe Leu Ala Arg Phe Ser Trp  
 305 310 315

ctg cat tcg agt tgg gcc cac gcc agc aac ttc gag atg cct cgg tac 1251  
 Leu His Ser Ser Trp Ala His Ala Ser Asn Phe Glu Met Pro Arg Tyr  
 320 325 330

atg aga tgg gcg gag aag gcc tcg ctc ctc ggg cac tac ggc gcc tca 1299  
 Met Arg Trp Ala Glu Lys Ala Ser Leu Leu Gly His Tyr Gly Ala Ser  
 335 340 345

atc ggc gcc gcc ttc tac att ttg ccc atc ccc cag gcc atc tgc tgg 1347  
 Ile Gly Ala Ala Phe Tyr Ile Leu Pro Ile Pro Gln Ala Ile Cys Trp  
 350 355 360 365

ctc ttc ttg tcg caa ctg ttt tgc ggc gct ctg ctc agc att gtc ttc 1395  
 Leu Phe Leu Ser Gln Leu Phe Cys Gly Ala Leu Leu Ser Ile Val Phe  
 370 375 380

gtg atc agc cac aat ggc atg gat gtg tac aac gac ccc cgg gac ttc 1443  
 Val Ile Ser His Asn Gly Met Asp Val Tyr Asn Asp Pro Arg Asp Phe  
 385 390 395

gtg acg gcc caa gtc acc tcg acc aga aac atc gaa ggc aac ttc ttc 1491  
 Val Thr Ala Gln Val Thr Ser Thr Arg Asn Ile Glu Gly Asn Phe Phe  
 400 405 410

aac gac tgg ttc acc gga ggc ctg aac agg cag att gag cac cat ctg 1539  
 Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu  
 415 420 425

ttt ccg tct ctt ccg agg cac aac ctc gcc aag gtc gcg cca cac gtc 1587  
 Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Val Ala Pro His Val  
 430 435 440 445

aag gcg ctc tgc gcc aag cac ggt ttg cat tac gaa gaa ttg agt ctg 1635  
 Lys Ala Leu Cys Ala Lys His Gly Leu His Tyr Glu Glu Leu Ser Leu  
 450 455 460

ggc acg gga gtc tgt cgt gtc ttc aat cgg cta gta gag gta gca tac 1683  
 Gly Thr Gly Val Cys Arg Val Phe Asn Arg Leu Val Glu Val Ala Tyr

465

470

475

gct gcg aaa gta tag atcgacgaga gtttcccacc aacacagtta gaacaaggga 1738  
 Ala Ala Lys Val  
 480

atagtacgag agaaggagac agcaacctgg actttttgtt cctgatgttg catactttct 1798  
 cgaatatacg tctccacgcc ttcaagtttc agcttcaact gattgtcttc agtaaccatc 1858  
 gcttgctcca actgggcgac ctgcagaatt gaagatcagt tttactgagt ttgtaccgag 1918  
 agtttcccaa attttgttgt aggctgatga cccaatccta gcatacactt taggaataag 1978  
 cagtctcaac ataattaggt ccatcattca gcaatttcga tacagcgcct gggattcgac 2038  
 gagtttacac gatgagtatg gcttgtaact ggccttctca aggtagcctt ggatctcccc 2098  
 gggcctcttg ccatcccatt cacccaatcg agattctgca gtctccaacc ttttctggaa 2158  
 gttctcaatc tgtaacctct gttgtagaga tagcatacgc cacaagacaa ggtctttgtg 2218  
 aacacagtcg tctaacaac agcaagttgt gtggattggc atctaaataa cgcctcttg 2278  
 tcaagtaaca gcaggtgttc cgcagtttcc aggaacatac tttgtttctg tcacagccag 2338  
 gcggtgaata gtaaagccaa ttcaacacat acgggagaag atgggtcgat atttgtatit 2398  
 ggcagggtgt ccagatttca cccatcagtc tctcacttgc ttgtatgtcc ctgacgtgct 2458  
 tcaaaatitit gcgcggggaa tcatcaatat acttaccatt tgtaaaaaaa aaaaaaaaaa 2518  
 a 2519

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 481

&lt;212&gt; PRT

<213> *Marchantia polymorpha*

&lt;400&gt; 2

Met	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu
1				5					10					15	
Trp	Ser	Lys	Trp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asn	Leu	Ser	Phe	Val	Ser	Arg	Lys
			20					25					30		
Glu	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Ser	Ser	Pro	Glu	Ala	Ser	Thr	Pro
			35				40					45			
Ala	Ala	Gln	Gln	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Arg	Glu	Ser	Ile	Pro	Glu	Gly
			50				55				60				
Phe	Leu	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	His	Asp	Asn	Pro	Ser	Asp	Cys

65	70	75	80
Trp Ile Val Ile Asn Asp Lys Val Tyr Asp Val Ser Ala Phe Gly Lys			
	85	90	95
Thr His Pro Gly Gly Pro Val Ile Phe Thr Gln Ala Gly Arg Asp Ala			
	100	105	110
Thr Asp Ser Phe Lys Val Phe His Ser Ala Lys Ala Trp Gln Phe Leu			
	115	120	125
Gln Asp Leu Tyr Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Ala Glu Pro Val Ser Glu			
	130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Arg Asp Leu Arg Thr Ala Phe Met Arg Ser Gln			
145	150	155	160
Leu Phe Lys Ser Ser Lys Met Tyr Tyr Val Thr Lys Cys Val Thr Asn			
	165	170	175
Phe Ala Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Val Ile Ala Trp Ser Gln Thr			
	180	185	190
Tyr Leu Ala Val Leu Cys Ser Ser Phe Leu Leu Ala Leu Phe Trp Gln			
	195	200	205
Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val Thr Glu			
	210	215	220
Asn Arg Ser Leu Asn Thr Tyr Phe Gly Gly Leu Phe Trp Gly Asn Phe			
225	230	235	240
Ala Gln Gly Tyr Ser Val Gly Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Val His			
	245	250	255
His Ala Ala Thr Asn Glu Cys Asp Asp Lys Tyr Gln Pro Ile Asp Pro			
	260	265	270
Asp Ile Asp Thr Val Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala			
	275	280	285
Thr Val Asp Asp Gln Phe Phe Arg Ser Ile Ile Ser Val Gln His Leu			
	290	295	300
Leu Phe Phe Pro Leu Leu Phe Leu Ala Arg Phe Ser Trp Leu His Ser			
305	310	315	320
Ser Trp Ala His Ala Ser Asn Phe Glu Met Pro Arg Tyr Met Arg Trp			
	325	330	335
Ala Glu Lys Ala Ser Leu Leu Gly His Tyr Gly Ala Ser Ile Gly Ala			
	340	345	350
Ala Phe Tyr Ile Leu Pro Ile Pro Gln Ala Ile Cys Trp Leu Phe Leu			
	355	360	365
Ser Gln Leu Phe Cys Gly Ala Leu Leu Ser Ile Val Phe Val Ile Ser			
	370	375	380
His Asn Gly Met Asp Val Tyr Asn Asp Pro Arg Asp Phe Val Thr Ala			
385	390	395	400
Gln Val Thr Ser Thr Arg Asn Ile Glu Gly Asn Phe Phe Asn Asp Trp			
	405	410	415
Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Ser			
	420	425	430
Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Val Ala Pro His Val Lys Ala Leu			
	435	440	445
Cys Ala Lys His Gly Leu His Tyr Glu Glu Leu Ser Leu Gly Thr Gly			
	450	455	460
Val Cys Arg Val Phe Asn Arg Leu Val Glu Val Ala Tyr Ala Ala Lys			

465  
Val

470

475

480

<210> 3  
 <211> 1577  
 <212> DNA  
 <213> Marchantia polymorpha

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (194)..(1066)

<400> 3  
 ctcaacgctc tctctcgccc gccctctgtc ttccgctgcg ccttcttctc ggcgctcttt 60  
 tctgtcgaga ggagcggcag ctgcagctct cgagagaggg gagcaggacg agagcgaggg 120  
 cgaatccgcc gagagtcgat cgggattggg tagaaggagg agaaggagga gaagaggagg 180  
 aggaggagca gcg atg gag gcg tac gag atg gtg gat agt ttt gtg tcg 229  
                   Met Glu Ala Tyr Glu Met Val Asp Ser Phe Val Ser  
                   1                  5                  10  
 aag acg gtt ttc gaa acg ctg cag aga ctg agg ggc gga gtc gtg ttg 277  
 Lys Thr Val Phe Glu Thr Leu Gln Arg Leu Arg Gly Gly Val Val Leu  
                   15                  20                  25  
 acg gaa tct gcg atc acc aaa ggt ttg cca tgc gtc gat agc ccg acg 325  
 Thr Glu Ser Ala Ile Thr Lys Gly Leu Pro Cys Val Asp Ser Pro Thr  
                   30                  35                  40  
 ccg atc gtt ctt ggg ttg tcg tcc tac ttg aca ttc gtg ttt ctc ggg 373  
 Pro Ile Val Leu Gly Leu Ser Ser Tyr Leu Thr Phe Val Phe Leu Gly  
                   45                  50                  55                  60  
 ctc att gtc atc aag agc ctg gat ctt aag ccc cgc tcc aag gag ccc 421  
 Leu Ile Val Ile Lys Ser Leu Asp Leu Lys Pro Arg Ser Lys Glu Pro  
                   65                  70                  75  
 gcc att ttg aac ctg ttt gtg atc ttc cac aac ttc gtc tgc ttc gca 469  
 Ala Ile Leu Asn Leu Phe Val Ile Phe His Asn Phe Val Cys Phe Ala  
                   80                  85                  90  
 ctc agt ctg tac atg tgc gtg gga att gtc cgt caa gct atc ctc aac 517  
 Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Val Arg Gln Ala Ile Leu Asn  
                   95                  100                  105  
 agg tac tct ctg tgg ggc aat gcg tac aat ccc aaa gaa gtt caa atg 565

Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys Glu Val Gln Met  
 110 115 120

ggc cac ctg ctc tac att ttc tac atg tca aag tac atc gag ttt atg 613  
 Gly His Leu Leu Tyr Ile Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Ile Glu Phe Met  
 125 130 135 140

gac acg gtc att atg att ttg aag cgc aac acg cgc cag atc act gtg 661  
 Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Asn Thr Arg Gln Ile Thr Val  
 145 150 155

ttg cat gtg tac cac cac gca tcc atc tcc ttc atc tgg tgg atc atc 709  
 Leu His Val Tyr His His Ala Ser Ile Ser Phe Ile Trp Trp Ile Ile  
 160 165 170

gcc tac cat gct cct ggc ggt gaa gct tat ttc tct gcc gca ttg aac 757  
 Ala Tyr His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Phe Ser Ala Ala Leu Asn  
 175 180 185

tcc gga gta cat gtg ctc atg tac ctc tac tac ctt ttg gca gca act 805  
 Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Leu Tyr Tyr Leu Leu Ala Ala Thr  
 190 195 200

ctg gga aag aac gag aaa gct cgc cgc aag tac cta tgg tgg gga aaa 853  
 Leu Gly Lys Asn Glu Lys Ala Arg Arg Lys Tyr Leu Trp Trp Gly Lys  
 205 210 215 220

tac ttg aca cag ctg cag atg ttc cag ttt gtc ctt aac atg att cag 901  
 Tyr Leu Thr Gln Leu Gln Met Phe Gln Phe Val Leu Asn Met Ile Gln  
 225 230 235

gct tac tac gat att aag aac aac tcg cct tac cca caa ttt ttg atc 949  
 Ala Tyr Tyr Asp Ile Lys Asn Asn Ser Pro Tyr Pro Gln Phe Leu Ile  
 240 245 250

cag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ctt tta gcg cta ttt gga aac 997  
 Gln Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Ala Leu Phe Gly Asn  
 255 260 265

ttt tac gtt cac aaa tac gta tca gcg ccc gca aaa cct gcg aag atc 1045  
 Phe Tyr Val His Lys Tyr Val Ser Ala Pro Ala Lys Pro Ala Lys Ile  
 270 275 280

aag agc aaa aag gca gaa taa gacaccaccc tagtgacaag aagattttac 1096  
 Lys Ser Lys Lys Ala Glu  
 285 290

actaaactgt agtttttagca cccatcggtg acacgaatac attctgggtc tgcctgtctt 1156

ggaagagtcg aagcattcag gagctctccc gtccatcga tcaaactcgg aacgaagtgc 1216

accttttagc tgcgatgaga gtctttactt cctgagccgt cgttcttgat gtggtctgta 1276  
 gctcagccat acgtgtagca tagctggaac atctggcttt tcaggaaagt cggcaaggca 1336  
 agaattcgac ccttgaacta gacaaggttc tgctgattca gcaaccatta gtgagtcact 1396  
 ggtaacaaa atcacagttt tgggccctta gttagtgaca accaacccta acactttgat 1456  
 acacgagtta tcgttcgcga gtggaagtgt aaaaatgtgc tttcccaatc atcttgagtt 1516  
 ggttcctttt gaagtaaagg aaaattctat gattgttgag tccaaaaaaa aaaaaaaaaa 1576  
 a 1577

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 290

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Marchantia polymorpha

&lt;400&gt; 4

Met	Glu	Ala	Tyr	Glu	Met	Val	Asp	Ser	Phe	Val	Ser	Lys	Thr	Val	Phe
1				5					10					15	
Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Thr	Glu	Ser	Ala
		20					25						30		
Ile	Thr	Lys	Gly	Leu	Pro	Cys	Val	Asp	Ser	Pro	Thr	Pro	Ile	Val	Leu
		35					40					45			
Gly	Leu	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr	Phe	Val	Phe	Leu	Gly	Leu	Ile	Val	Ile
	50					55					60				
Lys	Ser	Leu	Asp	Leu	Lys	Pro	Arg	Ser	Lys	Glu	Pro	Ala	Ile	Leu	Asn
65					70					75				80	
Leu	Phe	Val	Ile	Phe	His	Asn	Phe	Val	Cys	Phe	Ala	Leu	Ser	Leu	Tyr
			85						90					95	
Met	Cys	Val	Gly	Ile	Val	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Asn	Arg	Tyr	Ser	Leu
		100					105						110		
Trp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn	Pro	Lys	Glu	Val	Gln	Met	Gly	His	Leu	Leu
	115						120					125			
Tyr	Ile	Phe	Tyr	Met	Ser	Lys	Tyr	Ile	Glu	Phe	Met	Asp	Thr	Val	Ile
	130					135					140				
Met	Ile	Leu	Lys	Arg	Asn	Thr	Arg	Gln	Ile	Thr	Val	Leu	His	Val	Tyr
145					150					155				160	
His	His	Ala	Ser	Ile	Ser	Phe	Ile	Trp	Trp	Ile	Ile	Ala	Tyr	His	Ala
			165						170					175	
Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Tyr	Phe	Ser	Ala	Ala	Leu	Asn	Ser	Gly	Val	His
		180						185				190			
Val	Leu	Met	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Lys	Asn
		195				200						205			
Glu	Lys	Ala	Arg	Arg	Lys	Tyr	Leu	Trp	Trp	Gly	Lys	Tyr	Leu	Thr	Gln
	210					215						220			

Leu	Gln	Met	Phe	Gln	Phe	Val	Leu	Asn	Met	Ile	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Asp
225					230					235					240
Ile	Lys	Asn	Asn	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gln	Phe	Leu	Ile	Gln	Ile	Leu	Phe
			245						250					255	
Tyr	Tyr	Met	Ile	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr	Val	His
		260						265					270		
Lys	Tyr	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Lys	Pro	Ala	Lys	Ile	Lys	Ser	Lys	Lys
		275					280					285			
Ala	Glu														
	290														

<210> 5  
 <211> 2307  
 <212> DNA  
 <213> Marchantia polymorpha

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (375)..(1829)

<400> 5  
 tcacattgct ggtcgtcgga gggaggtgca caatctgggg ggctgtcatc aatgcgacgg 60  
 tgtttcgaag agatcgctgc gaggggcgct gagtttcttg ccgctttcta cctgagctga 120  
 tgcctgctgc tgctgcctag agctgcttgg tgctgcttgg ggctgctata agagcgcgctc 180  
 gacagcgagt gtctctcgcg gtcctcattc gtgggggtgct gtcgttccag tttagagccc 240  
 gctggacgta cagccggtgc tggaaattga ttttgtgaaa agcgagccta cctctatcca 300  
 tcacgtcgc ccgtggtggc agatcttccg gattcctcat gcgcggatcg tggtcgcttt 360  
 gaaggctgac agtt atg ccg cca cac gcc cct gac tcc aca ggt ctt ggg 410  
 Met Pro Pro His Ala Pro Asp Ser Thr Gly Leu Gly  
 1 5 10  
 ccc gaa gtt ttc cgc ctg cct gat gac gcg atc ccg gcc cag gat cgc 458  
 Pro Glu Val Phe Arg Leu Pro Asp Asp Ala Ile Pro Ala Gln Asp Arg  
 15 20 25  
 aga tct aca cag aag aaa tac tcg ctt tca gac gtc agc aag cac aac 506  
 Arg Ser Thr Gln Lys Lys Tyr Ser Leu Ser Asp Val Ser Lys His Asn  
 30 35 40  
 act ccg aat gat tgc tgg ctc gta att tgg ggg aag gtg tac gat gtt 554  
 Thr Pro Asn Asp Cys Trp Leu Val Ile Trp Gly Lys Val Tyr Asp Val  
 45 50 55 60

act tcg tgg gtt aag gtc cat cca ggt gga agt ctc atc ttt gtg aag	602
Thr Ser Trp Val Lys Val His Pro Gly Gly Ser Leu Ile Phe Val Lys	
65 70 75	
gcg gga cag gat tca aca caa ctc ttt gat tct tat cac ccc ctc tat	650
Ala Gly Gln Asp Ser Thr Gln Leu Phe Asp Ser Tyr His Pro Leu Tyr	
80 85 90	
gtc aga aag cta ctt gca cag ttc tgc att ggt gaa ctc caa acg agt	698
Val Arg Lys Leu Leu Ala Gln Phe Cys Ile Gly Glu Leu Gln Thr Ser	
95 100 105	
gcg gga gat gag aag ttc aag tct tca acg ttg gag tat gct ggt gaa	746
Ala Gly Asp Glu Lys Phe Lys Ser Ser Thr Leu Glu Tyr Ala Gly Glu	
110 115 120	
gaa cat gaa gta ttt tac cac act ctc aag cag cgc gtg gaa acg tac	794
Glu His Glu Val Phe Tyr His Thr Leu Lys Gln Arg Val Glu Thr Tyr	
125 130 135 140	
ttc cgc aag cag aag ata aat cct cga tac cat ccg caa atg ctt gtg	842
Phe Arg Lys Gln Lys Ile Asn Pro Arg Tyr His Pro Gln Met Leu Val	
145 150 155	
aag tca gcc gtg atc att gga acc ctt ctt ctc tgt tac tat ttt ggc	890
Lys Ser Ala Val Ile Ile Gly Thr Leu Leu Leu Cys Tyr Tyr Phe Gly	
160 165 170	
ttc ttc tgg tct caa aat gta ctc ctc tcg atg ttt ctg gca agc atc	938
Phe Phe Trp Ser Gln Asn Val Leu Leu Ser Met Phe Leu Ala Ser Ile	
175 180 185	
atg ggg ttc tgc act gcg gag gtg ggc atg tcc atc atg cac gat ggt	986
Met Gly Phe Cys Thr Ala Glu Val Gly Met Ser Ile Met His Asp Gly	
190 195 200	
aac cac gga tcg tac aca caa tct acc ttg ctt ggt tac gtc atg ggc	1034
Asn His Gly Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Leu Leu Gly Tyr Val Met Gly	
205 210 215 220	
gcc act ctt gat ctg gtg gga gct agc agt ttc atg tgg agg cag cag	1082
Ala Thr Leu Asp Leu Val Gly Ala Ser Ser Phe Met Trp Arg Gln Gln	
225 230 235	
cat gtg gcc ggg cac cac tcg ttc acc aac atc gac cat tac gat cca	1130
His Val Ala Gly His His Ser Phe Thr Asn Ile Asp His Tyr Asp Pro	
240 245 250	
gac att cgt gtg aag gat cct gat tta cga cgg gtt act tct caa caa	1178

Asp	Ile	Arg	Val	Lys	Asp	Pro	Asp	Leu	Arg	Arg	Val	Thr	Ser	Gln	Gln	
	255						260					265				
ccc	cga	aga	tgg	ttt	cac	gag	tat	cag	cat	atc	tac	tta	gga	gta	ctc	1226
Pro	Arg	Arg	Trp	Phe	His	Glu	Tyr	Gln	His	Ile	Tyr	Leu	Gly	Val	Leu	
	270					275				280						
tat	ggc	gtt	ctt	gcc	tta	aaa	agt	gtg	ttg	att	gat	gat	ttc	agc	gcc	1274
Tyr	Gly	Val	Leu	Ala	Leu	Lys	Ser	Val	Leu	Ile	Asp	Asp	Phe	Ser	Ala	
285					290					295					300	
ttc	ttc	agt	ggg	gct	atc	ggc	cca	gta	aag	ata	gct	caa	atg	aca	cca	1322
Phe	Phe	Ser	Gly	Ala	Ile	Gly	Pro	Val	Lys	Ile	Ala	Gln	Met	Thr	Pro	
				305					310					315		
ctc	gag	atg	ggc	gtc	ttc	tgg	gga	ggg	aag	gtt	gtg	tac	gca	ctg	tac	1370
Leu	Glu	Met	Gly	Val	Phe	Trp	Gly	Gly	Lys	Val	Val	Tyr	Ala	Leu	Tyr	
			320					325					330			
atg	ttt	ttg	ctc	cct	atg	atg	tat	ggg	caa	tac	aac	att	ctt	act	ttc	1418
Met	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Met	Tyr	Gly	Gln	Tyr	Asn	Ile	Leu	Thr	Phe	
		335					340				345					
att	ggg	ctc	tac	att	ctc	tca	cag	tta	gtt	gca	ggg	tgg	act	ctt	gcc	1466
Ile	Gly	Leu	Tyr	Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Val	Ala	Gly	Trp	Thr	Leu	Ala	
	350					355				360						
ctc	ttc	ttt	caa	gta	gca	cac	gtt	gtc	gac	gat	gca	gta	ttt	ccc	gtt	1514
Leu	Phe	Phe	Gln	Val	Ala	His	Val	Val	Asp	Asp	Ala	Val	Phe	Pro	Val	
365					370					375					380	
gcg	gaa	aca	gat	ggg	gga	aaa	gca	aag	att	cct	tct	ggg	tgg	gca	gaa	1562
Ala	Glu	Thr	Asp	Gly	Gly	Lys	Ala	Lys	Ile	Pro	Ser	Gly	Trp	Ala	Glu	
				385					390					395		
atg	cag	gtc	aga	acc	act	acc	aat	ttc	agc	tca	cga	tca	atg	ttc	tgg	1610
Met	Gln	Val	Arg	Thr	Thr	Thr	Asn	Phe	Ser	Ser	Arg	Ser	Met	Phe	Trp	
			400					405					410			
aca	cat	att	agt	ggc	ggg	ctg	aac	cat	cag	atc	gag	cac	cat	ctt	ttc	1658
Thr	His	Ile	Ser	Gly	Gly	Leu	Asn	His	Gln	Ile	Glu	His	His	Leu	Phe	
		415					420				425					
ccg	ggg	gtc	tgt	cat	gtt	cac	tac	cca	agc	ata	cag	cca	atc	gtg	aag	1706
Pro	Gly	Val	Cys	His	Val	His	Tyr	Pro	Ser	Ile	Gln	Pro	Ile	Val	Lys	
	430					435				440						
gct	acc	tgt	gac	gag	ttc	aac	gtg	cct	tat	act	tcc	tac	ccc	act	ttc	1754
Ala	Thr	Cys	Asp	Glu	Phe	Asn	Val	Pro	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Thr	Phe	
445					450					455					460	

tgg gcg gcc ctt agg gca cat ttt caa cat ctg aaa aac gtc gga cta 1802  
 Trp Ala Ala Leu Arg Ala His Phe Gln His Leu Lys Asn Val Gly Leu  
                   465                                  470                                  475

caa gat gga cta cga ctg gat ggc tga actgtgacag catgctttgg 1849  
 Gln Asp Gly Leu Arg Leu Asp Gly  
                   480                                  485

gcctgcactt tcagatttcg gatcgaaggt gcgggcgatg gaaataatca gataagagtt 1909  
 gtaagtaacg ttcaggagga gagcagaacg gattgatgag tgtccatttg tgaggcttcc 1969  
 acctttcagg aacagaagtt gattcgaatg cgaaacctcc aatgagcatt tcacagccgt 2029  
 cttctccttg gccatcatgt gttcctccta gggagcttcg gtttttggaa gttagtcagc 2089  
 ttactttcga agatcgttca acgctcaagg ctagattttg tcgacactat ttagtttaggt 2149  
 ccgatagata ggtgataaga ttccggtgcc ctcacacatg tttcatcagt tgcgatgtaa 2209  
 ttccagtaat ccacgtatgt ggctccagtg tctgctgaaa tcagcacagg cagctatatc 2269  
 atgctccttg atctctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2307

<210> 6

<211> 484

<212> PRT

<213> Marchantia polymorpha

<400> 6

Met Pro Pro His Ala Pro Asp Ser Thr Gly Leu Gly Pro Glu Val Phe  
   1                  5                                  10                                  15  
 Arg Leu Pro Asp Asp Ala Ile Pro Ala Gln Asp Arg Arg Ser Thr Gln  
                   20                                  25                                  30  
 Lys Lys Tyr Ser Leu Ser Asp Val Ser Lys His Asn Thr Pro Asn Asp  
                   35                                  40                                  45  
 Cys Trp Leu Val Ile Trp Gly Lys Val Tyr Asp Val Thr Ser Trp Val  
                   50                                  55                                  60  
 Lys Val His Pro Gly Gly Ser Leu Ile Phe Val Lys Ala Gly Gln Asp  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 Ser Thr Gln Leu Phe Asp Ser Tyr His Pro Leu Tyr Val Arg Lys Leu  
                   85                                  90                                  95  
 Leu Ala Gln Phe Cys Ile Gly Glu Leu Gln Thr Ser Ala Gly Asp Glu  
                   100                                  105                                  110  
 Lys Phe Lys Ser Ser Thr Leu Glu Tyr Ala Gly Glu Glu His Glu Val  
                   115                                  120                                  125  
 Phe Tyr His Thr Leu Lys Gln Arg Val Glu Thr Tyr Phe Arg Lys Gln  
                   130                                  135                                  140

Lys Ile Asn Pro Arg Tyr His Pro Gln Met Leu Val Lys Ser Ala Val  
 145 150 155 160  
 Ile Ile Gly Thr Leu Leu Leu Cys Tyr Tyr Phe Gly Phe Phe Trp Ser  
 165 170 175  
 Gln Asn Val Leu Leu Ser Met Phe Leu Ala Ser Ile Met Gly Phe Cys  
 180 185 190  
 Thr Ala Glu Val Gly Met Ser Ile Met His Asp Gly Asn His Gly Ser  
 195 200 205  
 Tyr Thr Gln Ser Thr Leu Leu Gly Tyr Val Met Gly Ala Thr Leu Asp  
 210 215 220  
 Leu Val Gly Ala Ser Ser Phe Met Trp Arg Gln Gln His Val Ala Gly  
 225 230 235 240  
 His His Ser Phe Thr Asn Ile Asp His Tyr Asp Pro Asp Ile Arg Val  
 245 250 255  
 Lys Asp Pro Asp Leu Arg Arg Val Thr Ser Gln Gln Pro Arg Arg Trp  
 260 265 270  
 Phe His Glu Tyr Gln His Ile Tyr Leu Gly Val Leu Tyr Gly Val Leu  
 275 280 285  
 Ala Leu Lys Ser Val Leu Ile Asp Asp Phe Ser Ala Phe Phe Ser Gly  
 290 295 300  
 Ala Ile Gly Pro Val Lys Ile Ala Gln Met Thr Pro Leu Glu Met Gly  
 305 310 315 320  
 Val Phe Trp Gly Gly Lys Val Val Tyr Ala Leu Tyr Met Phe Leu Leu  
 325 330 335  
 Pro Met Met Tyr Gly Gln Tyr Asn Ile Leu Thr Phe Ile Gly Leu Tyr  
 340 345 350  
 Ile Leu Ser Gln Leu Val Ala Gly Trp Thr Leu Ala Leu Phe Phe Gln  
 355 360 365  
 Val Ala His Val Val Asp Asp Ala Val Phe Pro Val Ala Glu Thr Asp  
 370 375 380  
 Gly Gly Lys Ala Lys Ile Pro Ser Gly Trp Ala Glu Met Gln Val Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Thr Thr Asn Phe Ser Ser Arg Ser Met Phe Trp Thr His Ile Ser  
 405 410 415  
 Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Gly Val Cys  
 420 425 430  
 His Val His Tyr Pro Ser Ile Gln Pro Ile Val Lys Ala Thr Cys Asp  
 435 440 445  
 Glu Phe Asn Val Pro Tyr Thr Ser Tyr Pro Thr Phe Trp Ala Ala Leu  
 450 455 460  
 Arg Ala His Phe Gln His Leu Lys Asn Val Gly Leu Gln Asp Gly Leu  
 465 470 475 480  
 Arg Leu Asp Gly

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>  
<221> n  
<222> (12)

<400> 7  
tggtggaarg anaarcayaa

20

<210> 8  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>  
<221> modified#base  
<222> (4)  
<223> i

<220>  
<221> modified#base  
<222> (7)  
<223> i

<220>  
<221> modified#base  
<222> (10)  
<223> i

<220>  
<221> modified#base  
<222> (13)  
<223> i

<400> 8  
rttnarnccn ccngtraacc a

21

<210> 9  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9

aagttgcctt cgatgtttct gg

22

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10

gctcgcttg agcaaggaaa tc

22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> modified#base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified#base

<222> (18)

<223> i

<400> 11

gtngarttya tggayacngt

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> modified#base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified#base

<222> (12)

<223> i

<400> 12

cknccccara anarrtaytt

20

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 13

gcgagctttc tcgttctttc cc

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 14

tatgattttg aagcgcaaca cg

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> modified#base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified#base  
<222> (9)  
<223> i

<220>  
<221> modified#base  
<222> (14)  
<223> i

<400> 15  
athrangrna artntaygay gt

22

<210> 16  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>  
<221> modified#base  
<222> (3)  
<223> i

<220>  
<221> modified#base  
<222> (6)  
<223> i

<220>  
<221> modified#base  
<222> (9)  
<223> i

<220>  
<221> modified#base  
<222> (18)  
<223> i

<400> 16  
ggnaynkwnt sdatrtcngg rtc

23

<210> 17  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 17

gtgtgtacga tccgtggta cc

22

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 18

aaggcgggac aggattcaac ac

22

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 19

ggaattcgcg atggcctcgt ccaccaccac

30

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 20

ggaattctac tttcgagcg tatgctacc

29

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 21  
ggaattcgcg atggaggcgt acgagatgg

29

<210> 22  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 22  
ggaattcttc tgcctttttg ctcttgatc

29

<210> 23  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23  
gttgaattcg acagttatgc cgccacacgc

30

<210> 24  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 24  
gttgaattca ggcccaaagc atgctgtcac

30

<210> 25  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 25

cgggacccctc tcctggcgca ccatcgtc

28

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 26

ggggtaccaa cgcgctttcc caccaacg

28

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 27

gctctagagc gatggcctcg tccaccacc

29

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 28

gctctagact atactttcgc agcgtatgc

29

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 29

gctctagagc gatggaggcg tacgagatgg

30

<210> 30  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 30  
gctctagatt attctgcctt ttgctc 27

<210> 31  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 31  
gctctagaga cagttatgcc gccacacgc 29

<210> 32  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 32  
gctctagaag gcccaaagca tgctgtcac 29

<210> 33  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 33  
caggaaacag ctatgacc 18

<210> 34

<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 34  
aaactgcaga ttcccgatct agtaacatag 30

<210> 35  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 35  
ccggaattcg catgcctgca ggtccccaga 30

<210> 36  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 36  
tgtaaaacga cggccagt 18

<210> 37  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Unknown Organism

<220>  
<221> Xaa  
<222> (4)  
<223> Description of Unknown Organism:conserved amino  
acid sequence

<400> 37  
Trp Trp Lys Xaa Lys His Asn  
1 5

<210> 38  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Unknown Organism

<220>  
<223> Description of Unknown Organism:conserved amino  
acid sequence

<400> 38  
Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn  
1 5

<210> 39  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Unknown Organism

<220>  
<223> Description of Unknown Organism:conserved amino  
acid sequence

<400> 39  
Val Glu Phe Met Asp Thr Val  
1 5

<210> 40  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Unknown Organism

<220>  
<223> Description of Unknown Organism:conserved amino  
acid sequence

<400> 40  
Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg  
1 5

<210> 41  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Unknown Organism

<220>  
<223> Description of Unknown Organism:conserved amino

acid sequence

<220>

<221> Xaa

<222> (2)

<223> Glu or Asn

<220>

<221> Xaa

<222> (3)

<223> Gly or Asp

<400> 41

Ile Xaa Xaa Lys Val Tyr Asp Val

1

5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: conserved amino  
acid sequence

<220>

<221> Xaa

<222> (5)

<223> Gln or Asp

<220>

<221> Xaa

<222> (6)

<223> Tyr or Thr

<220>

<221> Xaa

<222> (7)


<223> Met or Val

<400> 42

Asp Pro Asp Ile Xaa Xaa Xaa Pro

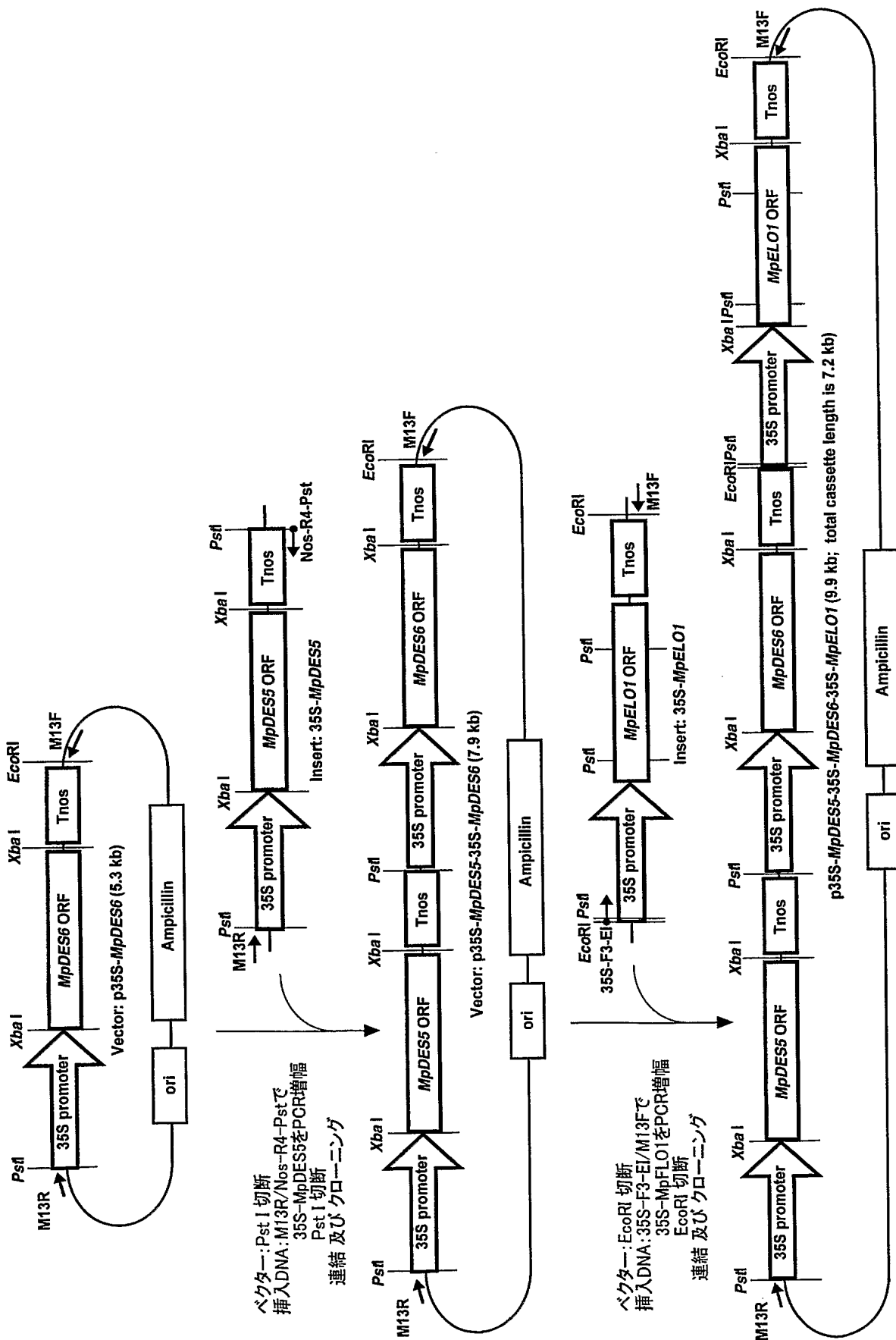
1

5



【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高等植物中でアラキドン酸やエイコサペンタエン酸（E P A）を生産し得る、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) 由来の高度不飽和脂肪酸合成系遺伝子、すなわち、 $\Delta$  5 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta$  6 脂肪酸不飽和化酵素及び  $\Delta$  6 脂肪酸鎖長延長酵素の遺伝子とその利用法を提供する。

【解決手段】 同一種のゼニゴケから、 $\Delta$  5 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta$  6 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子及び  $\Delta$  6 脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子を単離する。これらの遺伝子を高等植物に導入することにより、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸（E P A）を生産し得る形質転換植物体を取得する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 2 5 6 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 1 9 0 4 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 1 3 日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号  
氏 名 サントリー株式会社